

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencias

EL IGF-I COMO POTENCIAL AGENTE TERAPEUTICO EN ATAXIA DE FRIEDREICH

Carolina Franco Martínez del Solar
Madrid, 2012

I.	ABREVIATURAS	21
II.	INTRODUCCION	25
	1. Factores tróficos de la familia de la insulina	25
	1.1 IGF-I como factor trófico	25
	1.2 Receptores del IGF-I	26
	1.3 Señalización de IGF-I mediada por su receptor	27
	1. 3. 1 Ruta PI-3K	29
	1.3.1.1 Ruta PI-3K/AKT/mTOR	29
	1.3.2 Ruta MAPK	30
	1.4 El IGF-I y la mitocondria	30
	1.5 El IGF-I en el sistema nervioso central	31
	1.5.1 El IGF-I durante el desarrollo	31
	1.5.2 El IGF-I en la etapa adulta	32
	1.5.3 El IGF-I durante el envejecimiento	33
	1.6 El IGF-I sérico en el sistema nervioso central	34
	1.7 El IGF-I en enfermedades neurodegenerativas	34
	1.7.1 El IGF-I en enfermedades degenerativas del cerebelo	35
	1.8 El IGF-I y el estrés oxidativo	35
	2. Ataxia de Friedreich	36
	2.1 Genética de la Enfermedad	37
	2.2 Estructura y función de la frataxina	39
	2.3 Aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la FRDA	42
	2.4 Modelos experimentales de ataxia de Friedreich	43
III.	OBJETIVOS	47
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	51
	1. Animales de experimentación	51
	2. Materiales y Reactivos	53
	3. Anticuerpos	54
	4. Construcciones plasmídicas	55
	5. Generación y empaquetamiento de vectores virales	56

6. Cultivos celulares primarios	57
6.1 Cultivo de neuronas granulares de cerebelo	57
6.2 Cultivo de astrocitos de telencéfalo	58
6.3 Co-cultivo de neuronas granulares con astrocitos de telencéfalo	58
6.4 Cultivo de cardiomiocitos	58
6.5 Cultivo de neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal	59
7. Experimentos “in vitro”	59
7.1 Transducciones con vectores lentivirales	59
7.2 Transfecciones	60
7.3 Experimentos de estimulación con IGF-I	60
8. Experimentos “in vivo”	61
8.1 Administración crónica de IGF-I	61
8.2 Evaluación de la coordinación motora	61
8.3 Obtención de muestras biológicas	61
8.3.1 Extracción del suero	62
8.4 Administración de microesferas de IGF-I y evaluación de la supervivencia de los FASKO	62
9. Ensayos celulares	62
9.1 Determinación de la viabilidad neuronal en co-cultivos con astrocitos	62
9.2 Determinación de los niveles de estrés oxidativo	62
9.2.1 MitoSox Red	63
9.2.2 2,7 Diclorodihidrofluoresceína diacetato	63
9.3 Determinación de la viabilidad celular y función mitocondrial	63
10. Inmunoensayos	64
10.1 Western blot	64
10.2 ELISA de IGF-I humano y murino	65
10.3 Inmunocitoquímica	65
11. PCR cuantitativa (qPCR)	65
12. Array para genes de estrés oxidativo y respuesta antioxidante	66
13. Análisis estadístico	67
 V. RESULTADOS	 71
1. Generación de un modelo in vitro de falta de frataxina	71
1.1 Transducción de células con interferentes murinos de frataxina	71

1.2 Deleción de frataxina utilizando células de ratones transgénicos floxeados para frataxina	73
2. Efecto de la estimulación con IGF-I	75
2.1 IGF-I restaura frataxina y normaliza los niveles ROS en astrocitos transducidos con shRNA de frataxina	75
2.2 IGF-I normaliza la frataxina y ROS en neuronas con interferentes de frataxina	76
2.3 IGF-I aumenta frataxina a través de un efecto sobre las células control	76
2.4 IGF-I protege a las neuronas Δ Fxn a través de un efecto neuroprotector de los astrocitos	78
2.5 IGF-I aumenta frataxina en astrocitos pero no en neuronas precedentes de ratones C57BL6	78
3. Ruta de acción del IGF-I	79
3.1 La acción de IGF-I requiere de síntesis de novo de proteína	79
3.2 El IGF-I actúa sobre el mRNA de frataxina	80
3.3 La ruta utilizada por IGF-I es PI-3K/AKT/mTOR	81
3.3.1 El IGF-I utiliza la ruta PI-3K/AKT/mTOR para modular la frataxina en astrocitos	81
3.3.2 La vía AKT/mTOR también está activa en astrocitos y neuronas deficientes de frataxina	82
3.3.3 IGF-I activa mTOR en neuronas normales	83
4. Mecanismos subyacentes a la falta de efecto del IGF-I en neuronas	84
4.1 Diferencias entre los niveles basales de frataxina entre astrocitos y neuronas	84
4.2 La frataxina tiene una vida media más corta en neuronas	85
4.3 La degradación de frataxina es más rápida en neuronas que en astrocitos	85
5. El IGF-I como potencial agente terapéutico en FRDA	86
5.1 IGF-I restaura los problemas de coordinación motora en un modelo murino de FRDA	86
5.2 El IGF-I también actúa en células no neurales así como en células humanas	88
6. Impacto de la falta de frataxina en astrocitos in vivo	89

6.1 Generación y fenotipado del ratón FAsKO (frataxin astrocyte knockout mice)	89
6.2 Vulnerabilidad selectiva del cerebelo tras la ablación de frataxina en astrocitos	90
6.3 Desregulación del sistema IGF-I en el FAsKO	94
6.4 El IGF-I aumenta la supervivencia y mejora la actividad motora en los FAsKO	95
VI. DISCUSIÓN	99
1. Modelos celulares de deficiencia en frataxina	100
2. IGF-I como agente terapéutico en ataxia de Friedreich	100
2.1 IGF-I modula los niveles de frataxina	100
2.2 IGF-I como mediador de la neuroprotección frente al estrés oxidativo	102
2.3 IGF-I como agente neuroprotector en células deficientes de frataxina	102
2.4 IGF-I como tratamiento para ratones YG8R: un modelo murino de FRDA	103
3. Diferencias en la regulación de frataxina de acuerdo al tipo celular	104
4. Deficiencia de frataxina en astrocitos	106
4.1 Vulnerabilidad selectiva del cerebelo tras la ablación de frataxina en astrocitos	107
4.2 Relación de la frataxina y el sistema IGF-I	108
VII. CONCLUSIONES	115
VIII. BIBLIOGRAFÍA	119

ABREVIACIONES

- 4EBP1: *Factor 4E binding protein 1* / Proteína de unión al factor de iniciación eucariótico 4E-1
- Akt/PKB: *Active human protein kinase*
- ARCA: *Autosomal recessive cerebellar ataxia* / Ataxias cerebelosas autosómicas recesivas
- Bad: *Bcl-2-associated death promoter* / Promotor de muerte asociado a Bcl-2
- BSA: *Bovine serum albumin* / Albúmina de suero bovino
- CyaY: Homólogo de frataxina en bacteria
- DCF: Diclorofluoresceína
- DNA: *Deoxyribonucleic acid* / Ácido desoxirribonucleico
- EBSS: *Equilibrated balance salt solution* / Tampón salino equilibrado
- eIF4E: *Eukaryotic translation initiation factor* / Factor de iniciación eucariótico 4E
- FAsKO: *Frataxin astrocyte knockout mice* / Ratón deficiente de frataxina en astrocitos
- FBS: *Fetal bovine serum* / Suero fetal bovino
- FRDA: *Friedreich disease ataxia* / Ataxia de Friedreich
- Fxn: Frataxina
- GH: *Growth hormone* / Hormona de crecimiento
- GHRH: *Growth-hormone-releasing hormone* / Hormona liberadora de la hormona de crecimiento
- HBS 2X: HEPES buffered saline / Solución salina tamponada con HEPES
- HDACi: *Histone deacetylase inhibitor* / Inhibidor de la histona desacetilasa
- IGFBPs: *Insulin growth factor binding proteins* / Proteínas transportadoras de IGFs
- IGF-I: *Insulin-like growth factor I* / Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I
- IGF-II: *Insulin-like growth factor II* / Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo II
- IGFIR: *Insulin-like growth factor I Receptor* / el receptor de IGF-I
- IGFIIR: *Insulin-like growth factor II receptor* / Receptor de IGF-II
- IR: *Insulin receptor* / Receptor de insulina
- IRS: *Insulin receptor substrate* / Sustratos para el receptor de insulina
- ISC: *Iron sulfur cluster* / Grupos de hierro–azufre
- LID: *Liver IGF-I deficient mice* / Ratón deficiente de IGF-I en hígado
- LOCA: *Late-onset cerebellar atrophies* / Atrofia cerebelar de inicio tardío
- LTP: *Long term potentiation* / Potenciación a largo plazo
- MAP: *Mitogen-activated protein* / Proteínas activadas por mitógeno
- MAPK: *Mitogen-activated protein kinase* / Proteína quinasa activada por mitógeno
- MCK: *Muscle creatine kinase* / Creatina quinasa de músculo
- MPP: *Mitochondrial processing protease* / Peptidasa de procesamiento mitocondrial

- mRNA: *Messenger RNA* / RNA mensajero
- mTOR: *Mammalian target of rapamycin*
- mTORC1: Complejo sensible a rapamicina
- mTORC2: Complejo insensible a rapamicina
- MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difenil-tetrazolio
- NSE: *Neuron-specific enolase* / Enolasa específica neuronal
- OPCA: *Olivopontocerebellar atrophy* / Atrofia olivo-ponto-cerebelosa
- PB: Tampón fosfato
- PBS: Tampón fosfato salino
- PFA: Paraformaldehído
- PGC-1: *PPAR γ coactivator 1* / Co-activador de PPAR γ
- PI: *Phosphoinositide* / Fosfoinosítidos
- PI-3K: *Phosphoinositide 3-kinase* / Fosfatidil 3 quinasa inositol
- PPAR γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* / Receptor γ activado por proliferador de peroxisomas
- CoQ10: Coenzima Q10
- raptor: *Regulatory-associated protein of mTOR*
- Rhu-EPO: *Recombinant human erythropoietin* / Eritropoyetina humana recombinante
- rictor: *Rapamycin-insensitive companion of mTOR*
- RNA: *Ribonucleic acid* / Ácido ribonucleico
- ROS: *Reactive oxygen species* / Especies reactivas del oxígeno
- SNC: Sistema nervioso central
- SOD: Superóxido dismutasa
- TTBS: Tampón tris salino con tween-20
- YAC: *Yeast artificial chromosome* / Cromosoma artificial de levadura
- Yhf1: Homólogo de frataxina en levadura

INTRODUCCIÓN

1. Factores tróficos de la familia de la insulina

La familia de péptidos de la insulina en los vertebrados incluye tres ligandos: la insulina, el factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I del inglés, *insulin-like growth factor I*) y el factor de crecimiento parecido a la insulina tipo II (IGF-II del inglés, *insulin-like growth factor II*). Las tres moléculas derivan de un único péptido presente en los cordados primitivos (Chan et al, 1990) y poseen una estructura molecular similar compuesta por dos cadenas peptídicas unidas por puentes disulfuro. Estas moléculas utilizan, con cierta promiscuidad, varios receptores que activan quinasas y fosfatasa que incluso pueden funcionar como moduladores transcripcionales (Sehat et al, 2010). En mamíferos, la insulina, el IGF-I y el IGF-II son considerados hormonas periféricas aunque ahora también se sabe que tienen funciones en el cerebro.

Los IGFs son componentes integrales de múltiples sistemas que controlan el crecimiento, desarrollo y metabolismo (Humbel, 1990). Evolutivamente, la familia de los IGFs ha mantenido un papel preponderante en procesos homeostáticos relacionados con la reproducción, maduración, crecimiento, metabolismo energético y longevidad (Tatar et al, 2003). Estos factores fueron descubiertos en la década de los 50 por Salmon y Daughaday. Estos autores demostraron que tras la administración *in vivo* de la hormona de crecimiento (GH del inglés, *growth hormone*) se estimulaba la secreción de un factor capaz de estimular la captación de sulfato en el cartílago de ratas hipofisectomizadas. Este péptido era el IGF-I y se le denominó así porque dos décadas después fue aislado e identificado como una molécula que tiene gran similitud con la insulina (Rinderknecht and Humbel, 1978).

1.1 IGF-I como factor trófico

El IGF-I es una hormona proteica de 70 aminoácidos que tiene un peso de 7.5 kDa y presenta una 70% de homología estructural con el IGF-II y un 48% con la insulina (Rinderknecht y Humbel, 1978). Los niveles de IGF-I sérico en un hombre adulto son de unos 200ng/ml mientras que en el momento del nacimiento son aproximadamente la mitad que en adultos. Antes de entrar en la pubertad, el IGF-I alcanza los niveles de adulto y tiene un pico (2-3 veces más) en la pubertad (Daughaday y Rotwein, 1989).

El IGF-I forma parte del eje hipotálamo-hipófisis-hígado y está encargado de regular el crecimiento corporal. En el hipotálamo se sintetiza la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH del inglés, *Growth-hormone-releasing hormone*) así como la somatostatina.

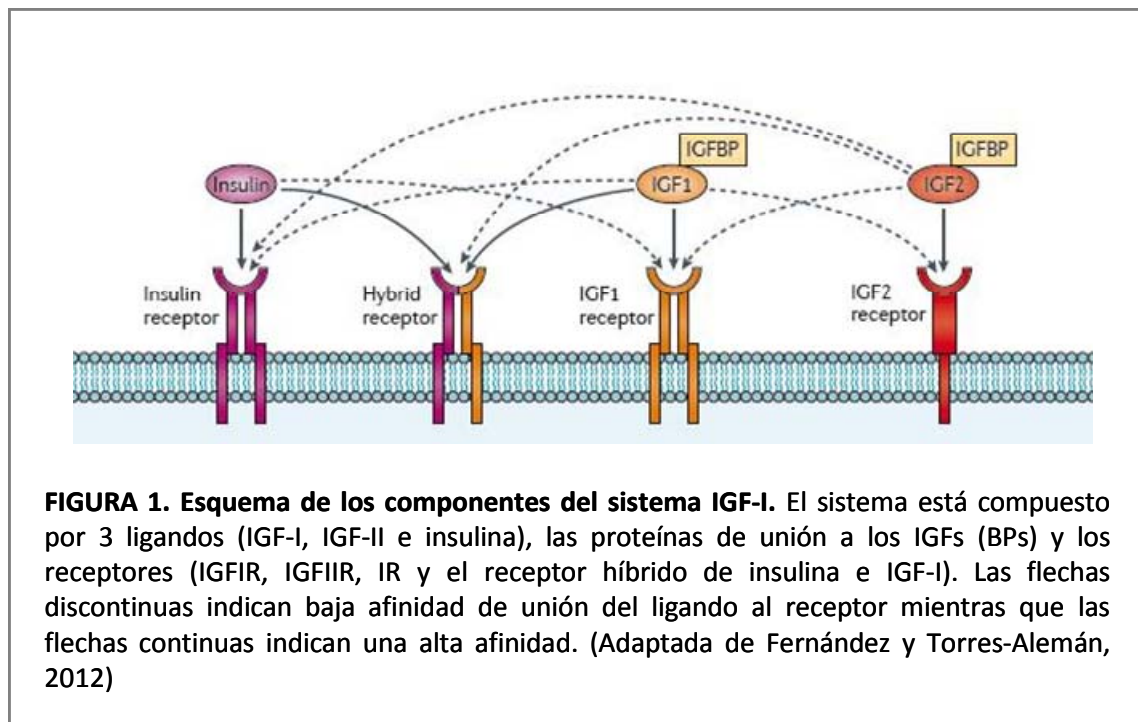
Por un lado, la GHRH estimula la producción y liberación de GH en sangre cuando llega a la adenohipófisis. Por otro lado, la somatostatina se encarga de inhibir la síntesis y/o secreción de la GH para regular los niveles de esta hormona en sangre. La GH es captada por el hígado y promueve la síntesis y secreción de IGF-I. Este factor de crecimiento es transportado por los vasos sanguíneos hasta los órganos diana donde ejerce sus efectos tróficos. Si bien el IGF-I es sintetizado mayoritariamente por el hígado, el resto de tejidos periféricos como el hueso, el cartílago, el músculo esquelético, el sistema nervioso central, etc.; son capaces de sintetizarlo aunque en menor cantidad (Casella et al, 1987; Kajimoto y Rotwein, 1989; Lowe et al, 1988; Lowe et al, 1987; Yakar et al, 1999). La teoría tradicional sobre el IGF-I y el eje hipotálamo-hipófisis-hígado se ha reformado dado que el IGF-I también puede ser sintetizado independientemente de la acción de la GH. Esto ocurre, por ejemplo, en el sistema nervioso central donde el eje clásico discurre en paralelo con la secreción paracrina del mismo (Hernandez-Sanchez et al, 1995).

En sujetos normales, el 99% de IGF-I circulante está unido a las denominadas proteínas transportadoras de IGFs (IGFBPs del inglés, *insulin growth factor binding proteins*). Estas proteínas actúan como moduladoras de la acción del IGF-I controlando su disponibilidad y su vida media en sangre (D'Ercole et al, 2002; Duan y Xu, 2005; Garcia et al, 1987). En mamíferos se han caracterizado seis IGFBPs, las cuales tiene mayor afinidad por este factor neurotrófico que su receptor (Hwa et al, 1999). La IGFBP3 es la principal proteína de unión al IGF-I mientras que en el sistema nervioso adulto es la IGFBP2 (Ocrant et al, 1990).

1.2 Receptores del IGF-I

El IGF-I actúa de muchas maneras para ejercer sus funciones en las células, como son la mitogenesis, la actividad metabólica y la apoptosis. Se conocen tres tipos de receptores específicos para el IGF-I: el receptor de IGF-I (IGFIR del inglés, *insulin-like growth factor I receptor*), el receptor de IGF-II (IGFIIR del inglés, *insulin-like growth factor II receptor*) y el receptor de insulina (IR del inglés, *insulin receptor*). Así mismo, el IGFIR y IR pueden formar híbridos funcionales (**figura 1**) (Fernández y Torres-Alemán, 2012).

El principal receptor del IGF-I es el IGFIR. Este es una proteína transmembrana que pertenece a la familia de los receptores tirosina-quinasa (Gronborg et al, 1993). El IGFIR es una proteína tetramérica que posee dos subunidades alfas a la que se une el IGF-I y dos subunidades beta que tienen actividad tirosina quinasa. Ambas subunidades se hallan unidas por puentes disulfuro formando un holoreceptor heterodímero maduro $\alpha 2\beta 2$.

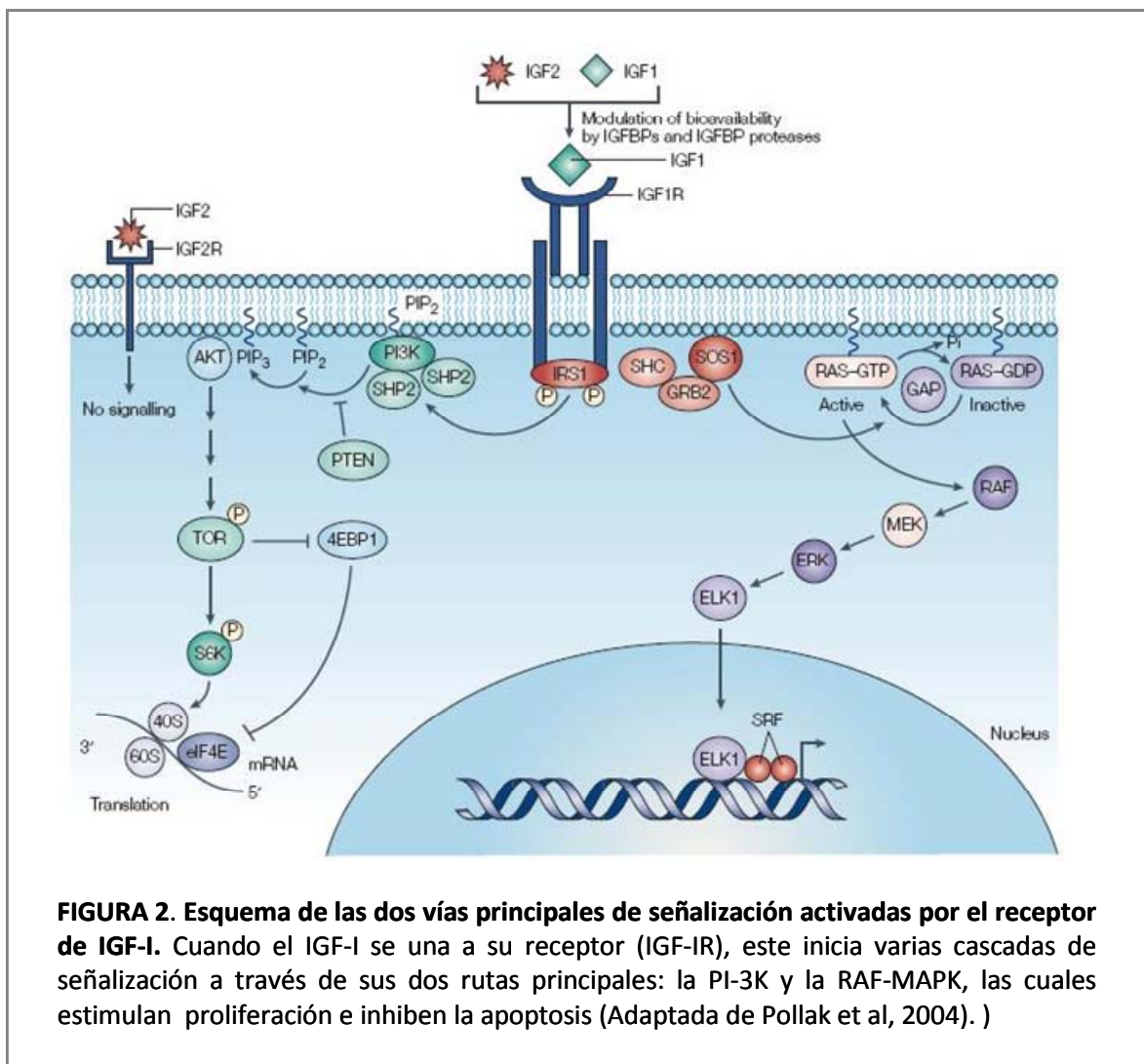


El receptor de IGF-I presenta homología con el receptor de la insulina (LeRoith et al, 1995), principalmente en su dominio tirosina quinasa (Pandini et al, 2002). El IGFIR es capaz de unir insulina pero con una afinidad de 100 a 1000 veces menor que la que presenta para el IGF-I y también puede unir IGF-II con una afinidad de 2 a 50 veces menor al IGF-I (D'ercole, 1996). Por el contrario, IGFIIIR es muy diferente al anterior, siendo idéntico a los receptores de manosa 6 fosfato independientes de cationes; éste une con gran afinidad al IGF-II, con poca al IGF-I y con una afinidad nula a la insulina (LeRoith et al, 1995). El IR también puede unir IGF-I e IGF-II pero con una afinidad menor que insulina. Finalmente, los receptores híbridos unen insulina e IGF-I con la misma afinidad lo cual sugiere cierta cooperatividad entre estas dos moléculas.

1.3 Señalización de IGF-I mediada por su receptor

La unión de los IGFs al IGFIR activa varias rutas de señalización intracelular conservadas a lo largo de la filogenia. Es importante señalar que a pesar de que la función principal de la insulina es regular los niveles de glucosa y la del IGF-I es mediar los efectos de la GH sobre el crecimiento somático, las dos moléculas presentan superposición de funciones y similitud en las cascadas que activan (Barbieri et al, 2003). Esta señalización intracelular está mediada al menos por dos vías, la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK del inglés, *mitogen-activated protein kinase*) y la vía del fosfatidil 3 quinasa inositol (PI-3K del inglés, *phosphoinositide 3-kinase*) (LeRoith, 2000).

El IGF-I se une a la subunidad alfa extracelular del receptor e induce cambios conformacionales en la subunidad beta lo que conlleva a una autofosforilación en múltiples residuos de tirosina. Una vez que el IGFIR está activado, éste fosforila a sus principales sustratos: los sustratos para el receptor de insulina (IRS del inglés, *insulin receptor substrate*). La fosforilación en tirosina de los IRSs permite que interaccionen con proteínas que contienen el dominio SH2, en este grupo se encuentra la p85, que es la subunidad reguladora de la PI-3K. Por otra parte, la proteína Shc es fosforilada directamente por el IGFIR y se une al complejo GRB2/SOS. Tanto el IRS-1 como la proteína Shc inician varias cascadas de señalización intracelular: la de la PI-3K y la de MAPK (Figura 2).



1. 3. 1 Ruta PI-3K

Esta ruta está implicada, principalmente, en procesos metabólicos, de crecimiento celular y antiapoptóticos (Manning y Cantley, 2007; Yuan y Yankner, 2000). El IGF-I se une a su receptor y fosforila a las proteínas adaptadoras, los IRSs. Una vez que el IRS-1/2 se encuentra activo, interacciona con la subunidad reguladora de la PI-3K, la p85. A su vez la p85 activa a la subunidad catalítica, p110 y conduce a PI-3K a la membrana celular (Shepherd et al, 1998). Cuando la PI-3K se localiza en la membrana, cataliza la fosforilación de los fosfoinosítidos (PI del inglés, *phosphoinositide*) produciendo PI-3-fosfato, PI-3,4-bifosfato y PI-3,4,5-trifosfato (Kapeller y Cantley, 1994). Los PIs se unen a dominios específicos de al menos 2 proteínas, la serina- treonina quinasa Akt/PKB y a la PDK-1. Cuando Akt/PKB está activa, ejerce sus acciones mediante la fosforilación de una gran cantidad de proteínas sustrato. La activación de Akt es una señal en la activación de la vía del IGF-1 y juega un papel fundamental en la prevención de la muerte celular por apoptosis (Dudek et al, 1997) ya que inactiva factores apoptóticos e induce factores anti-apoptóticos (Vincent y Feldman, 2002). Por ejemplo, Akt fosforila e inactiva a la proteína proapoptótica Bad (Wang et al, 1999), a la caspasa-9 (Datta et al, 1999), o a la proteína mTOR (del inglés, *mammalian target of rapamycin*) (Sekulić A et al, 2000).

1.3.1.1 Ruta PI-3K/AKT/mTOR

mTOR es una proteína serina/treonina quinasa que regula el crecimiento, proliferación, motilidad, y supervivencia celular, la síntesis de proteínas, y la transcripción (Hay y Sonenberg, 2004). mTOR pertenece a la familia de la PI-3K.

Existen dos complejos que contienen mTOR: el complejo sensible a rapamicina (mTORC1), que se define por su interacción con la proteína raptor (del inglés, *regulatory-associated protein of mTOR*) (Sarbasov et al, 2005b), y un complejo insensible a rapamicina (mTORC2), que se define por su interacción con rictor (del inglés, *rapamycin-insensitive companion of mTOR*) (Sarbasov et al, 2005a).

Por un lado, la ruta raptor-mTOR regula el crecimiento celular a través de S6K1 y 4E-BP1. Está ruta responde a IGF-I, en parte debido a reguladores como TSC1/TSC2 y rheb. Por otro lado, el complejo rictor-mTOR regula Akt/PKB, PKC α , Rho/rac, para controlar la supervivencia celular, la proliferación, el metabolismo y el citoesqueleto.

Específicamente, la fosforilación de mTOR ocurre por AKT a través de la inactivación del complejo TSC. Cuando TSC2 es fosforilado por AKT, su actividad GAP se bloquea, y se rompe el complejo TSC1/TSC2 lo que permite a Rheb unirse a ATP y pasar del estado GDP inactivo al estado activo. Rheb, unido a GTP, activa a mTOR y fosforila a sus proteínas dianas como la p70S6K y la 4EBP1. La proteína p70S6K activa a su vez a la proteína ribosomal S6, mientras que la proteína de unión al factor de iniciación 4E-1 (4EBP1 del inglés, *factor 4E binding protein 1*) cuando esta fosforilado, libera al factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E del inglés, *eukaryotic translation initiation factor*). Ambos activan la maquinaria que regula la síntesis proteica y promueve el crecimiento celular (Hay y Sonenberg, 2004).

1.3.2 Ruta MAPK

Las proteínas activadas por mitógeno (MAP del inglés, *mitogen-activated protein*) pertenecen a la familia de las quinasas serina/treonina que está muy conservada entre los eucariotas. Las MAPK son activadas por diversos estímulos incluidos el del IGFIR (Cobb y Goldsmith, 1995; Dews et al, 2000). Esta vía se encuentra principalmente implicada en procesos de mitogénesis y diferenciación celular (Avruch, 1998) y también está relacionada con la regulación de la apoptosis (Valentinis et al, 1999; Huang et al, 2007). Sin embargo, como ocurre con todas las rutas de señalización, el papel de esta ruta en definitiva depende del contexto celular y el tipo de célula.

1.4 El IGF-I y la mitocondria

La mitocondria parece ser una de las dianas celulares más importantes del IGF-I. Se ha mostrado que el efecto citoprotector del IGF-I está estrechamente relacionada con una protección mitocondrial, lo que lleva a una reducción en la producción intramitocondrial de radicales libres, de daño oxidativo así como a un aumento en la producción de ATP (Puche et al, 2008).

Las mitocondrias del cerebro son dianas importantes del IGF-I (Nishijima et al, 2010). Se ha visto que el IGF-I inhibe la reducción del potencial de membrana mitocondrial, la liberación del citocromo C, la actividad caspasa 3 y la apoptosis en diferentes tipos celulares (Leininger et al, 2004; Kondo et al, 2002; Ness et al, 2004). Y también, que mejora la actividad mitocondrial (García-Fernández et al, 2008; Bijur y Jope, 2003).

1.5 El IGF-I en el sistema nervioso central

El IGF-I es un factor pleiotrópico con un amplio espectro de acción en diferentes tejidos incluido el sistema nervioso central. El descubrimiento de cantidades importantes de IGFs en el cerebro así como de la expresión diferencial de IGF-I, IGF-II y sus receptores (regulados por el desarrollo) ha mostrado el importante papel que juegan en el cerebro (Humbel, 1990).

Los IGFs afectan la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de todos los tipos celulares del cerebro (D'Ercole et al, 1996). También promueven el establecimiento de poblaciones celulares y circuitos para mantener la homeostasis energética. Los niveles de IGF-I durante el desarrollo son muy importantes para la formación de astrocitos (Desai et al, 2011; Torres-Alemán et al, 1994) así como en el desarrollo de neuronas. Además es necesario para los diferentes pasos de la maduración neuronal que incluyen la formación de neuritas, la axogénesis y guía axonal, el establecimiento de sinapsis y la formación de circuitos (Fernández y Torres-Alemán, 2012). IGF-I también participa en la producción y migración de neuronas GABAérgicas (Oishi et al, 2009) y glutamatérgicas (Hurtado-Chong et al, 2009) y en la sinaptogénesis del hipocampo (O'Kusky et al, 2000), contribuyendo así a la formación de circuitos en el hipocampo, bulbo y corteza (Oishi et al, 2009; Sosa et al, 2006; Ozdinler y Macklis, 2006). La formación de órganos sensoriales (i.e. el ojo y el oído) también necesita de la actividad de IGF-I (Sánchez-Calderón et al, 2010; Ciucci et al, 2007).

1.5.1 El IGF-I durante el desarrollo

Durante el desarrollo, el IGF-I es producido prácticamente por todo el cerebro y su receptor está expresado en los diferentes tipos celulares (neuronas, glia, etc.) (Bondy, 1991; Bach et al, 1991). El IGF-II y su receptor también están presentes desde etapas tempranas del desarrollo así como la mayoría de las IGFBPs que se encuentran en las diferentes estructuras del cerebro (Bondy y Lee, 1993). La generación de un ratón transgénico carente de IGF-I permitió mostrar el rol central de esta molécula durante el desarrollo del sistema nervioso central. Se vio que la mayoría de estos ratones mueren a los pocos días de nacidos y presentan un cerebro de menor tamaño con pérdida neuronal y de oligodendrocitos y con una hipomielinización (Liu et al, 1993; Beck et al, 1995). Es interesante señalar que los picos de expresión de IGF-I coinciden temporalmente con los períodos del desarrollo en que se produce la proliferación de neuronas progenitoras.

Así mismo, el desarrollo de diferentes modelos transgénicos Cre/LoxP mostró que el circuito de IGF-I es responsable de que diferentes estructuras se formen adecuadamente, ya que actúa como coordinador entre distintas poblaciones, modulando gran parte de los tipos celulares que componen el tejido cerebral. La sobreexpresión de IGF-I en el cerebro genera un sobrecrecimiento cerebral postnatal sin anomalías anatómicas (Ye et al, 2004), mientras que la expresión ectópica de IGFBP1 presenta un retardo en el crecimiento del mismo, presumiblemente inhibiendo la activación del IGFIR (D'Ercole et al, 1994).

1.5.2 El IGF-I en la etapa adulta

En el adulto, la principal diferencia es que los niveles de mRNA de IGF-I en cerebro caen mucho y se expresa básicamente en hipocampo, cerebelo, corteza y médula espinal (Bondy, 1991). Los niveles de receptor por el contrario se mantienen constantes en todas las áreas cerebrales y las IGFBPs presentan localizaciones muy específicas aunque en general también presentan disminución en sus niveles de expresión (Ocrant et al, 1990; Albiston y Herington, 1992; Stenvers et al, 1994; Naeve et al, 2000; Gonda et al, 2007). Es interesante señalar que los niveles cerebrales de IGF-I se mantienen relativamente constantes durante la vida adulta, aunque caen con la edad como en el resto del organismo (Sonntag et al, 1999). Sin embargo, la expresión del mRNA de IGF-I es muy baja en el cerebro. Esta aparente contradicción se explica por la entrada del IGF-I sérico al cerebro a través de la barrera hematoencefálica (Carro et al, 2000). Por su parte, la expresión del IGF-II es mayor que la del IGF-I pero se encuentra limitada a tejidos no-neuronales como los plexos coroides y el epitelio (Stylianopoulou et al, 1988).

En el sistema nervioso adulto, el IGF-I muestra una diversidad de funciones biológicas, muy diferentes entre sí, que afectan a todos los tipos celulares. El IGF-I actúa como un potente factor neuroprotector (Carro y Torres-Alemán, 2006; Russo et al, 2005). Se ha visto que en sistemas *in vitro* previene la apoptosis inducida por el β -amiloide (Dore et al, 1999; Dore et al, 1997; Niikura et al, 2001), el glutamato (Vincent et al, 2004), la privación de suero (D'Mello et al, 1997; Galli et al, 1995), la privación de potasio (Yamagishi et al, 2003; Zhong et al, 2004), entre otros mientras que tras su administración *in vivo* revierte y previene el desarrollo de ataxia cerebelosa (Fernández et al, 1999; Zhong et al, 2005) y reduce el área de infarto producida por isquemia-hipoxia (Brywe et al, 2005; Liu et al, 2001). El IGF-I también actúa como factor trófico para la supervivencia de las neuronas inhibiendo la apoptosis neuronal (Chrysis et al, 2001; Dudek et al, 1997). Además, se encuentra implicado en importantes aspectos de la función cerebral (Trejo et al, 2004). Su efecto engloba muchas acciones, como la regulación de la liberación de

neurotransmisores (Seto et al, 2002), la utilización de glucosa en determinadas áreas cerebrales (Lynch et al, 2001), la modulación de los canales iónicos (Blair y Marshall, 1997), la excitabilidad neuronal (Núñez et al, 2003), la sinaptogénesis (O'Kusky et al, 2003), la neurogénesis hipocampal del adulto (Trejo et al, 2008), así como gran variedad de acciones reguladoras sobre la sinapsis las cuales son capaces de modular la inducción de LTP (del inglés, *long term potentiation*) en el hipocampo afectando el aprendizaje y la memoria (Trejo et al, 2007). Además produce modulación de la astrogliosis en respuesta al daño cerebral (Fernández et al, 1997).

1.5.3 El IGF-I durante el envejecimiento

Existe una relación entre el eje somatotrópico y las disfunciones asociadas al envejecimiento: se ha visto que existe un descenso en el funcionamiento del eje somatotrópico (IGF-I y GH) durante la senescencia (Ceda et al, 2005; Corpas et al, 1993). El IGF-I cae con el envejecimiento y se correlaciona con el desempeño cognitivo en ancianos (Aleman et al, 1999). Así mismo, el IGF-I modula alguno de los procesos que se encuentran alterados durante la vejez como son: la angiogénesis (López-López et al, 2004), la neurogénesis (Trejo et al, 2001), la plasticidad sináptica (Ramsey et al, 2004) y el aprendizaje (Svensson et al, 2006). Los trastornos más importantes encontrados en el cerebro envejecido (la disfunción celular, el deterioro metabólico así como la acumulación anómala de sustancias potencialmente nocivas) pueden ser atribuidos a una reducción en la función del IGF-I en el cerebro, una condición muy ligada al proceso de envejecimiento (Trejo et al, 2004).

Es necesario señalar que existe mucha controversia sobre este tema. Se ha visto que la disminución de los niveles de IGF-I, de su receptor, y en general del eje somatotrópico, están relacionados con un aumento en la esperanza de vida. Esto se ha demostrado en ratones (Kappeler et al, 2008), en humanos (Suh et al, 2008), en *Caenorhabditis elegans* (Murphy et al, 2003) y también en *Drosophila melanogaster* (Clancy et al, 2001). Además, se ha visto que la inactivación parcial del IGFIR en ratones también aumenta la resistencia al estrés oxidativo (Holzenberger et al, 2003). Estudios epidemiológicos han mostrado que los niveles de IGF-I en la sangre están relacionados positivamente con el riesgo de padecer cáncer (LeRoith y Roberts, 2003) aunque también en este tema existe bastante controversia. Cohen ha propuesto un modelo que explica esta paradoja (Cohen y Dillin, 2008). Cada organismo tendría un nivel óptimo de señalización de insulina/IGF-I el cual maximiza su reproducción, su salud y su longevidad. Las variaciones en este equilibrio pueden producir enfermedades y dar lugar a una disminución en la esperanza de vida.

1.6 El IGF-I sérico en el sistema nervioso central

Los bajos niveles de expresión del mRNA de IGF-I, así como la amplia expresión de los receptores en el cerebro adulto de los mamíferos, sugieren que el IGF-I periférico tiene un papel muy importante en el cerebro (Carro et al, 2000; Trejo et al, 2001). Esto ha generado un debate sobre la importancia del IGF-I endocrino frente al autocrino-paracrino en el cerebro (Carro y Torres-Alemán, 2006). Los trabajos de nuestro laboratorio sugieren que el IGF-I circulante tiene un papel central en el sistema nervioso. Recientemente, se ha mostrado un mecanismo por el cual el IGF-I ingresa a regiones activas del cerebro a través de los vasos sanguíneos (Nishijima et al, 2010).

Se ha mostrado que el IGF-I puede entrar al sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica (al parénquima cerebral) o de los plexos coroideos (al líquido cefalorraquídeo) (Nishijima et al, 2010; Carro et al, 2005). Las células endoteliales de los vasos sanguíneos cerebrales, así como las células epiteliales de los plexos coroideos, expresan niveles muy altos de IGFIR (Bondy et al, 1993) lo que permitiría que el IGF-I ingrese mediante transcitosis. Una inyección sistémica de IGF-I marcado con yodo 125 permitió mostrar que este péptido en el plexo coroideo, eminencia media, y los vasos sanguíneos (Reinhardt y Bondy, 1994).

El modelo murino LID (del acrónimo en inglés, *liver IGF-I deficient*) es un ratón transgénico que no produce IGF-I en el hígado (LeRoith et al, 2001). Este ratón ha permitido diferenciar los efectos del IGF-I periférico del local en el sistema nervioso. Estos ratones presentan complicaciones neurológicas (deficiencias en la memoria espacial y alteraciones morfológicas como la atrofia del giro dentado) (Trejo et al, 2007) pero sin presentar cambios en el crecimiento corporal (Yakar et al, 1999). Esto muestra la importancia que tiene el IGF-I sérico en el cerebro y lo necesario que es la entrada de este péptido en el cerebro.

1.7 El IGF-I en enfermedades neurodegenerativas

Se ha visto que los niveles de IGF-I en cerebro y suero están alterados en patologías degenerativas de diferente tipo u origen genético como lo son la enfermedad de Alzheimer, el ictus o la esclerosis lateral amiotrófica (Torres-Alemán et al, 1998; Wilczak et al, 2003; Busiguina et al, 2000). Es por esto que las propiedades neuroprotectoras y neurotróficas del IGF-I (Carro et al, 2002; Dudek et al, 1997; Fernández et al, 1998; Trejo et al, 2004), junto a sus efectos terapéuticos en numerosos procesos neurodegenerativos (Dore et al, 1997), han sugerido que las alteraciones en la acción del IGF-I podría ser un mecanismo implicado en la patogénesis o en el desarrollo de

estos procesos (Trejo et al, 2004). Por ejemplo, se ha visto que el IGF-I promueve el aclaramiento del péptido β -amiloide, a través de la barrera hematoencefálica, y por tanto protege contra la enfermedad de Alzheimer (Carro et al, 2002).

1.7.1 El IGF-I en enfermedades degenerativas del cerebelo

El cerebelo es una de las áreas del sistema nervioso central (SNC) que tiene más IGF-I durante la etapa adulta y es por eso lógico que cambios en el sistema IGF-I estén asociados con enfermedades cerebelosas. Se han visto cambios en el sistema IGF-I del suero de pacientes con atrofia olivo-ponto-cerebelosa (OPCA del inglés, *olivopontocerebellar atrophy*), atrofia cerebelar de inicio tardío (LOCA del inglés, *late-onset cerebellar atrophies*), o ataxia telangiectasia (Busiguina et al, 2000; Torres-Alemán et al, 1996), entre otras. Además, existen varios ejemplos en modelos experimentales de ataxia cerebelosa que muestran que una disfunción en el sistema IGF-I contribuye a la muerte neuronal (Fernández et al, 1998; Lee et al, 1995; Vig et al, 1994; Zhang et al, 1996; Zhang et al, 1999). Por ejemplo, se ha visto que en ratones *weaver* atáxicos, los niveles IGFBP-5 son altos en el cerebelo lo cual podría ser la razón de la resistencia a IGF-I que presentan estos ratones. Además, animales atáxicos (sea con ataxia esporádica o hereditaria) recuperan la coordinación motora tras ser tratados con IGF-I (Carro et al, 2001; Fernández et al, 1998). En este sentido, el tratamiento con IGF-I a pacientes con ataxia espinocerebelosa, muestra que estos pacientes presentan una progresión más lenta de la enfermedad (Arpa et al, 2011).

Todo lo expuesto anteriormente sugiere que el IGF-I estaría implicado en enfermedades degenerativas del cerebelo, independientemente de la causa de las mismas. El IGF-I sería esencial para preservar la viabilidad celular, y disfunciones en su señalización (por deficiencia o por resistencia) conducirían a una muerte prematura.

1.8 El IGF-I y el estrés oxidativo

Uno de los factores comunes en las enfermedades neurodegenerativas es la generación de radicales libres de oxígeno y el aumento en el daño oxidativo. Se ha visto que estos procesos neurodegenerativos pueden estar asociados con alteraciones en el sistema IGF-I, sugiriendo que estos tres eventos podrían estar interconectados. Existe mucha controversia sobre el papel del IGF-I frente al estrés oxidativo. Por un lado se ha mostrado un efecto neuroprotector del IGF-I frente al estrés oxidativo en neuronas del cerebelo de rata (Heck et al, 1999) y del hipotálamo (Sortino y Canonico, 1996). Por otra lado, otros grupos han mostrado que el IGF-I pierde su

capacidad neuroprotectora cuando hay niveles altos de estrés oxidativo (Dávila y Torres-Alemán, 2008; Zhong y Lee, 2007).

Dentro de los trabajos que apoyan la idea que el IGF-I previene y protege frente al estrés oxidativo, hay modelos de envejecimiento o de neurotoxicidad inducida por dopamina. Se ha visto que dosis bajas de IGF-I, en un modelo de envejecimiento, reduce el daño oxidativo (en cerebro e hígado), normaliza la actividad de enzimas antioxidantes y restaura la función mitocondrial (García-Fernández et al, 2008). Se ha sugerido que altos niveles de dopamina inducen apoptosis a través de aumentos en los niveles de estrés oxidativo en las células (Ziv et al, 1996) y, en estas condiciones, el IGF-I sería capaz de proteger cultivos neuronales de humanos y de roedores (Offen et al, 2001).

La activación de IGFIR protege a células mesangiales de una amplia gama de estímulos apoptóticos (Barinder et al, 2003). Se ha mostrado que la adición de IGF-I previene la autofagia cuando se retira el suero (Rottenberg, 2000). Finalmente, se ha reportado que el IGF-I regula diferencialmente Bcl-XL y Bax y confiere una protección al miocardio en el corazón de rata (Yamamura et al, 2001).

Como ya mostramos anteriormente, existe un gran número de enfermedades neurodegenerativas asociadas con aumentos en los niveles de estrés oxidativo. En esta tesis nos centramos en evaluar el papel del IGF-I en una de ellas: la ataxia de Friedreich (FRDA del inglés, *Friedreich disease ataxia*).

2. Ataxia de Friedreich

La ataxia de Friedreich fue descrita en 1863 por Nicholas Friedreich (Espinós-Armero et al, 2005; Palau y Espinós, 2006) y pertenece al grupo de enfermedades cerebelosas hereditarias (ARCA del inglés, *autosomic recessive cerebellar ataxia*) como lo son también la ataxia telangiectasia y la ataxia ligada a la deficiencia en vitamina E. La FRDA es una enfermedad neurodegenerativa con herencia autosómica recesiva siendo la más común de las ataxias hereditarias y tiene una incidencia de 1 de cada 50,000 europeos y afecta de manera indistinta a hombres y mujeres.

Los cambios patológicos de la FRDA afectan tanto al sistema nervioso central como al periférico (Pandolfo, 1999). La enfermedad comienza con una degeneración progresiva de las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRGs del inglés, *dorsal root ganglia*) en el sistema nervioso periférico. Además, en el sistema nervioso central se encuentran también afectados la médula

espinal (las columnas de Clarke y los tractos espinocerebelosos), el cerebelo (los núcleos profundos, i.e. dentado, y en la corteza cerebelar, el *vermis* y los dos hemisferios) y el bulbo raquídeo (núcleos neuronales tales como *gracilis* y *cuneatus*). Algunos pacientes presentan manifestaciones extraneurológicas como deterioros en la producción de ATP mitocondrial (Lodi et al, 1999), defectos esqueléticos (i.e. escoliosis) y/o resistencia a la insulina (Coppola et al, 2009). Además, se ha observado que un 70% sufre de cardiomiopatía hipertrófica (Isnard et al, 1997; Bit-Avragim et al, 2001), un 30% desarrollan diabetes mellitus tipo I (Ristow et al, 2003; Pomplun et al, 2007) y un 20% sufren de intolerancia a la glucosa (Finocchiaro et al, 1988).

La sintomatología en la ataxia de Friedreich suele aparecer entre los 5 y los 15 años de edad. Después de 10-20 años de la aparición de los primeros síntomas, el paciente está confinado a una silla de ruedas y se vuelve totalmente incapacitado en etapas posteriores. Los síntomas son muy diversos e incluyen entre los más frecuentes: ataxia, disartria, *nistagmus*, disfagia, rigidez y atonía muscular o deformidades en los pies, entre otras. La evolución de la patología varía entre los pacientes. La mayoría de ellos fallecen a causa de un problema cardíaco en torno a los 35 años (Palau, 2001).

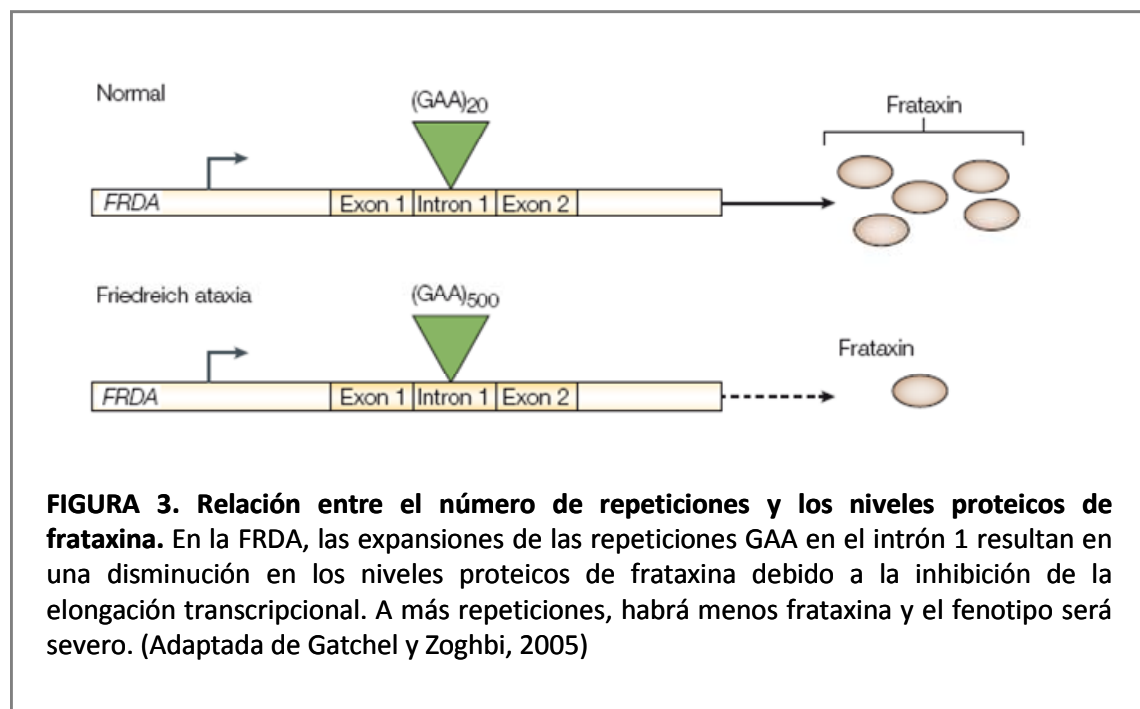
2.1 Genética de la Enfermedad

La ataxia de Friedreich está asociada con el gen FXN, o también conocido como X25, que está ubicado en el cromosoma 9q13 (Chamberlain et al, 1988). Este gen codifica una proteína mitocondrial: la frataxina. Más del 95% de los pacientes tienen expansiones inestables de GAA en ambos alelos del intrón 1, mientras que en una minoría se ha observado que uno de los alelos presenta las expansiones de GAA, mientras que el otro tiene una mutación puntual de pérdida de función en este gen (De Castro et al, 2000).

El gen de la frataxina está compuesto por 7 exones (exones 1-4, 5a, 5b y 6). El más común de los transcritos está compuesto por los 5 primeros exones y codifica la frataxina que posee 210 aminoácidos (Campuzano et al, 1996). La frataxina se encuentra bastante conservada a lo largo de la evolución y se han descritos genes ortólogos en muchas especies (Koutnikova et al, 1997), siendo los dominios más conservados el exón 4 y el 5a.

Las personas sanas tienen un número de repeticiones de GAAs en el gen de la frataxina dentro del rango de 10 y 60; pasado este número se encuentran en el umbral de inestabilidad lo cual está asociado con presentar síntomas de la enfermedad. Los pacientes FRDA suelen tener entre 500 y

1700 repeticiones en ambos alelos (Campuzano et al, 1996). Las expansiones de GAA generan un descenso en los niveles de transcripción (**figura 3**). Los pacientes presentan entre 4% y 29% de frataxina en comparación con los controles normales (Campuzano et al, 1997). Actualmente existen dos hipótesis para explicar por qué los tripletes son capaces de generar una reducción de los niveles de expresión de frataxina. La primera se basa en la formación de estructuras aberrantes de DNA (“*sticky*” DNA), que interfieren en la enlogación transcripcional (Ohshima et al, 1998). En el caso específico de la FRDA, estas estructuras resultan de la asociación intramolecular de los tripletes (le Proust et al, 2000). La segunda hipótesis se basa en la heterocromatinización del gen de la frataxina. Estudios epigenéticos en pacientes de ataxia de Friedreich muestran un aumento en la metilación del DNA en diferentes tipos celulares, una reducción en los niveles de acetilación de la histona H3 y H4 y una hipermetilación de la histona H3 lisina (Greene et al, 2007; Herman et al, 2006).



Es interesante señalar que existen correlaciones entre el fenotipo de los pacientes y la longitud de los tripletes. Los pacientes que tienen un mayor número de tripletes en el alelo de menor tamaño desarrollan antes la enfermedad, presentan síntomas más severos y la progresión de la misma es más rápida (Durr et al, 1996). El número de repeticiones también está asociada a la aparición de cardiomiopatías o resistencia a la insulina, aunque no se ha encontrado ninguna correlación con la diabetes (Coppola et al, 2009).

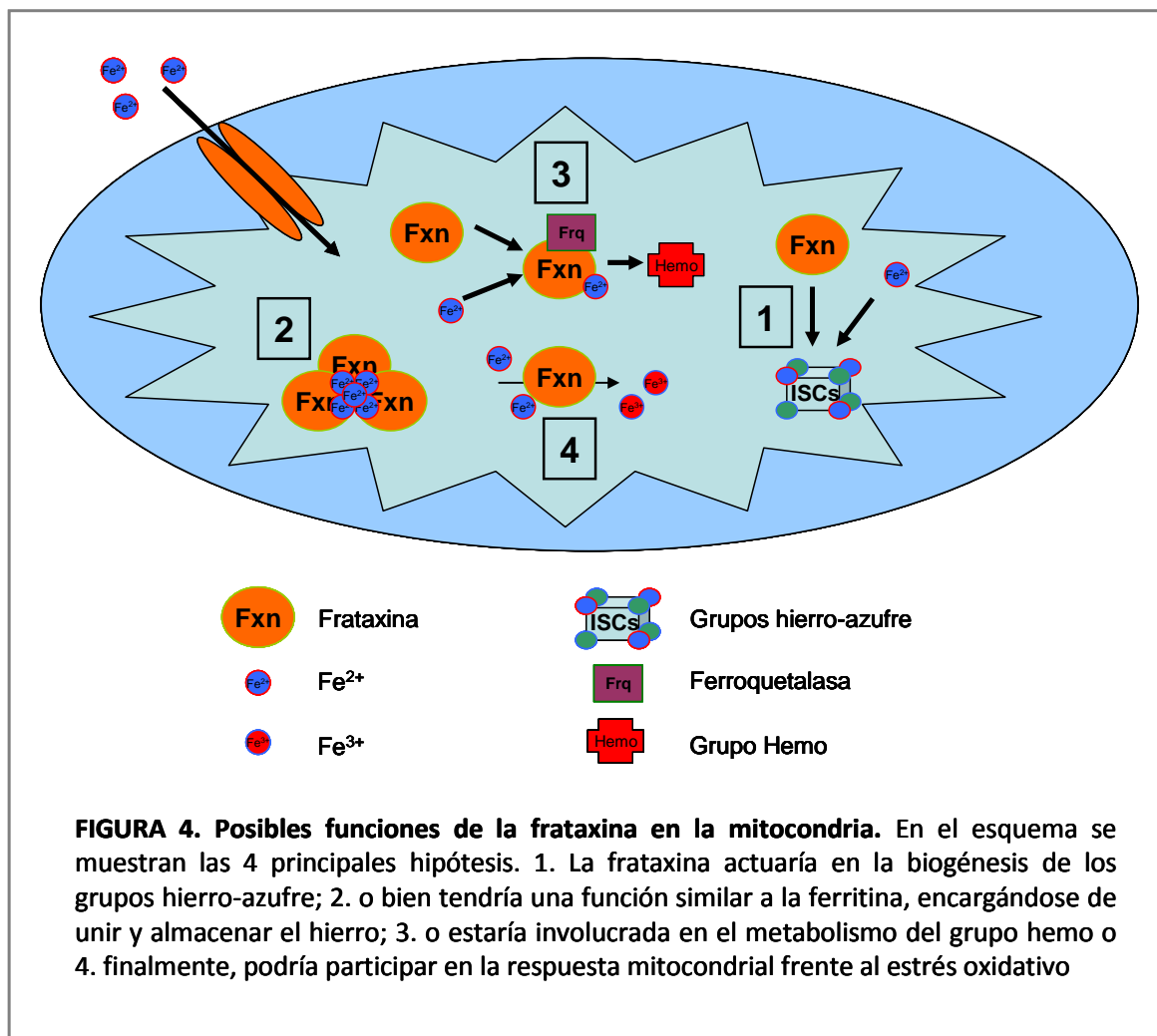
2.2 Estructura y función de la frataxina

La frataxina se localiza en la matriz mitocondrial, y es una proteína muy conservada entre eucariotas y algunos procariotas (Campuzano et al, 1996). Esta proteína es traducida por ribosomas citoplasmáticos e importada a la mitocondria donde se corta secuencialmente para así dar lugar a la proteína madura. En levaduras, así como en humanos, la maduración de la frataxina depende de la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP del inglés, *mitochondrial processing protease*) (Branda et al, 1999). En humanos existen al menos 3 isoformas descritas, siendo la mayoritaria la isoforma A que consta de 210 aminoácidos (Marmolino, 2011).

La frataxina humana se expresa de forma ubicua, en el adulto, es más abundante en tejidos de alto requerimiento energético como son el corazón y el SNC (sobretudo, en la médula espinal), tiene una expresión media en hígado, músculo esquelético y páncreas, y mínima en el resto de tejidos analizados (Campuzano et al, 1996). En general, la expresión de frataxina es mayor en las áreas más afectadas de FRDA, tanto dentro como fuera del SNC. Es importante señalar que a día de hoy no se conocen los mecanismos de regulación de la frataxina, los que podrían explicar hasta cierto punto la expresión diferencial que existe entre diferentes tejidos. Sin embargo, se sabe que la frataxina es degradada a través del proteosoma (Rufini et al, 2011). Por último, no se puede descartar la posibilidad que existan diferentes mecanismos regulatorios entre las diferentes especies y tipos celulares.

La frataxina, así como sus ortólogos, en levadura (Yhf1) y bacteria (CyaY), tienen la capacidad de unir moléculas de hierro, probablemente a través de los residuos ácidos que se encuentran entre las dos α -hélices (Bencze et al, 2006). La mayoría de las proteínas de unión a metales suelen coordinar el hierro a través de las cisteínas (que pueden ser coadyuvadas por histidinas o grupos ácidos) mientras que la frataxina lo hace únicamente con glutamatos y aspartatos que se encuentran en la superficie de la proteína. Es importante señalar que la capacidad de unión al hierro no es selectiva, ya que puede unir prácticamente cualquier catión divalente o trivalente (Nair et al, 2004). Además, se ha demostrado que la sustitución de residuos que están involucrados en la unión del hierro impide el ensamblaje de los grupos Fe-S, disminuye la interacción con las proteínas del grupos Fe-S y aumenta el daño oxidativo (Foury et al, 2007). Estos resultados sugieren que la función de la frataxina está ligada a la capacidad de mediar la interacción proteína-proteína mediante el hierro.

La función de la frataxina ha sido ampliamente estudiada desde que se conoce que la deficiencia de la misma era la responsable de la ataxia de Friedreich. Hasta el momento, la función exacta de ésta no se conoce, aunque se ha sugerido que está involucrada en el metabolismo del hierro intracelular y que es probable que su deficiencia sea la causante de un aumento de los niveles de estrés oxidativo intracelular (Gakh et al, 2006; Calabrese et al, 2005) (**figura 4**).



Actualmente, la hipótesis que tiene mayor aceptación es que la frataxina tiene una función en la biogénesis de los grupos de hierro-azufre (ISC del inglés, *iron sulfur cluster*) (Muhlenhoff et al, 2002). Esta idea comenzó cuando varios estudios mostraron que tanto los pacientes de FRDA como los ratones *knockout* condicionales de frataxina tienen deficiencia en proteínas que contienen ISCs. Además se observó que había interacción entre la frataxina y el complejo de formación de los complejos Fe-S e Isu1/Nifs (Gerber et al, 2003; Mühlenhoff et al, 2002; Yoon y Cowan, 2003). Se ha postulado que la frataxina actúa como una chaperona que cede el hierro al complejo NSF1/ISCU, o como una proteína destoxicante que previene que haya un exceso de

hierro en la mitocondria y lo mantiene biodisponible para los aceptores clave. Esta función está basada en la capacidad funcional que tiene la frataxina de unirse al hierro. Sin embargo, es importante destacar que si la frataxina tiene un papel en este proceso, éste no sería esencial, ya que en ausencia de frataxina, hay síntesis de ISCs aunque en niveles más bajos (Duby et al, 2002).

La segunda hipótesis sobre la función celular de la frataxina radica en que la frataxina tendría una función muy similar a la ferritina; es decir, de unión y almacenamiento de hierro dentro de la mitocondria (Isaya et al, 2004). En concentraciones fisiológicas de hierro, la frataxina es capaz de autoensamblarse y proteger al hierro de las reacciones de oxidación en la mitocondria (Adamec et al, 2000; Gakh et al, 2002; Karlberg et al, 2006). En contra de esta hipótesis hay dos puntos importantes: el primero es que la oligomerización de la proteína no es necesaria para su funcionamiento (Aloria et al, 2004), lo que apoyaría la idea que la frataxina tiene varios roles dependiendo de las necesidades metabólicas de la célula; el segundo es que organismos superiores tienen una ferritina especializada en la mitocondria y se ha visto que cuando es sobreexpresada en levadura previene la acumulación del hierro causada por la delección de *Yfh1*, sugiriendo que esta función sería redundante en mamíferos (Levi et al, 2001).

La tercera hipótesis sugiere que la frataxina tendría un papel en el metabolismo del grupo hemo. Se ha demostrado que la frataxina interacciona con la ferroquelatasa (enzima que cataliza el último paso de la biosíntesis del grupo hemo), y se ha postulado que los oligómeros de *Yfh1* podrían proporcionar el hierro a la ferroquelatasa, estimulando así la síntesis del grupo hemo (Park et al, 2003). Es decir, la frataxina estaría actuando como una chaperona de hierro, capaz de mantenerlo unido y biodisponible hasta cederlo a la ferroquelatasa para la síntesis del grupo hemo. Sin embargo, el hecho que haya poca frataxina y que la cantidad de hierro en la matriz mitocondrial exceda ampliamente la capacidad de unión de hierro que tiene la frataxina cuestiona que ésta tenga un papel como chaperona mitocondrial de hierro (Seguin et al, 2009).

Por ultimo, se ha visto que la deficiencia de frataxina está relacionada con un aumento en los niveles de estrés oxidativo (Al-Mahdawi et al, 2006; Busi et al, 2006), lo que podría tener un rol central en la FRDA. Se ha mostrado que la producción de radicales libres de oxígeno (ROS del inglés, *reactive oxygen species*) está aumentada en cultivos celulares con bajos niveles de frataxina (Santos et al, 2001), que los fibroblastos de pacientes son más sensibles a los oxidantes (Jiralerspong et al, 2001) y que la homeostasis del glutatión, un antioxidante natural, está afectada en linfoblastos de pacientes FRDA (Napoli et al, 2006). Esto último implica que las concentraciones del glutatión reducido estarán disminuidas y, por ende, se aumentarán los niveles

de ROS. Es por esto que la cuarta hipótesis radica en que la frataxina podría estar involucrada en el control de los niveles de estrés oxidativo celular mediante una reducción de las especies reactivas de oxígeno. Se ha mostrado que la frataxina protege al DNA de daños causado por la oxidación del hierro debido al estrés oxidativo (O'Neill et al, 2005; Gakh et al, 2006). Este posible rol es muy fácil de relacionar con la hipótesis que indica que frataxina tendría una función parecida a la ferritina y/o o la de chaperona. Es decir, la frataxina podría unir el Fe^{2+} , transformarlo a Fe^{3+} gracias a su actividad ferroxidasa y mantenerlo unido pero de una forma biodisponible y así impedir que el Fe^{2+} reaccione con el superóxido y genere ROS mediante una reacción de Fenton.

2.3 Aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la FRDA

Actualmente no existe ningún tratamiento efectivo para la ataxia de Friedreich. Muchos grupos de investigación se encuentran desarrollando nuevas aproximaciones terapéuticas, gracias al conocimiento que se tiene sobre la enfermedad y al conocimiento del gen responsable de la misma. Las aproximaciones que se usan en estos momentos se basan en intentar aumentar los niveles proteicos de la frataxina o modular la cascada patogénica que se genera ante la deficiencia de frataxina.

Los primeros ensayos se realizaron con compuestos antioxidantes, por ejemplo, vitamina E y coenzima Q10 (CoQ10). Esto se debe a que las células deficientes de frataxina generan más radicales libres y son más susceptibles al daño oxidativo. Además, se ha comenzado a utilizar la idebenona (Hausse et al, 2002; Seznec et al, 2004), un análogo de la CoQ10 que es capaz de entrar a la mitocondria de una manera más eficiente que la CoQ10. La idebenona se encuentra en ensayos clínicos de fase III. Estudios preliminares mostraron que la idebenona mejoraba la función cardíaca pero sin afectar la progresión de la enfermedad o el estado neurológico de los pacientes (Rustin et al, 1999). Recientemente, se ha publicado que esta droga no disminuye la hipertrofia ventricular ni mejora la función cardíaca en un grupo de pacientes con FRDA (Lagedrost et al, 2011).

Debido a la acumulación anormal de hierro en los pacientes con FRDA, otra opción es realizar una terapia con quelantes de hierro usando compuestos que puedan unir hierro y quitarlo de la mitocondria (Li et al, 2008). Dentro de este grupo de fármacos, el que está teniendo más éxito es la deferiprona, que se encuentra en fase II. Este quelante es capaz de distribuirse rápidamente en el SNC atravesando membranas y penetrando a la mitocondria para retirar el exceso de hierro.

Este compuesto ha generado mucha expectativa: en un estudio piloto se ha visto que la deferiprona reduce las acumulaciones de hierro en el núcleo dentado y mejora la ataxia en pacientes (Boddaert et al, 2007). A pesar de estos prometedores hallazgos, estudios en diversas células humanas tratadas con deferiprona han dado resultados contradictorios. Por un lado, se ha mostrado que el tratamiento con 50 μ M de deferiprona en células HEK 293T deficientes en frataxina restaura el potencial redox mitocondrial, reduce la acumulación de ROS y la apoptosis, y aumenta la actividad de la aconitasa (Kakhlon et al, 2008). En contraste, se ha visto que una dosis alta de deferiprona en fibroblastos provenientes de pacientes inhibe la actividad de la aconitasa y el crecimiento celular (Goncalves et al, 2008), y que en pacientes puede llegar incluso a empeorar la ataxia.

Finalmente, la estrategia más utilizada es la de aumentar los niveles proteicos de frataxina dado que los pacientes presentan niveles muy bajos en comparación con las personas sanas. La eritropoyetina humana recombinante (Rhu-EPO del inglés, *recombinant human erythropoietin*) ha mostrado ser capaz de aumentar los niveles de frataxina en diferentes líneas celulares de FRDA como linfocitos, cardiomiocitos y fibroblastos cardíacos así como en la línea celular P19 – la cual es un derivado neuronal (Sturm et al, 2005). La Rhu-EPO afecta a la proteína sin estimular la síntesis del mRNA, lo que sugiere que actuaría sobre la estabilidad de la proteína o la maduración de la misma (Acquaviva et al, 2008). Por otra parte, los inhibidores de la histona desacetilasa (HDACi del inglés, *histone deacetylase inhibitor*) contrarrestan el efecto de la condensación de la cromatina, causado por las expansiones GAA, y por ende aumentan la expresión de frataxina (Herman et al, 2006; Rai et al, 2008). Por último, estudios empleando agonistas del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR γ del inglés, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) han observado aumentos en los niveles de la proteína y del mRNA de frataxina, restaurando los niveles de superóxido dismutasa (SOD) *in vitro* e *in vivo* y reduciendo los niveles de estrés oxidativo vía activación del co-activador de PPAR γ (PGC-1 del inglés, *PPAR γ coactivator 1*) (Marmolino et al, 2009).

2.4 Modelos experimentales de ataxia de Friedreich

La frataxina es una proteína altamente conservada, lo que permite desarrollar modelos en diferentes organismos. Cada uno de estos modelos tiene usos específicos y contribuye de diferente manera a mejorar nuestro entendimiento sobre la función de la frataxina (y por ende sobre la enfermedad) y nos permite así probar nuevos enfoques terapéuticos. Así mismo, se emplean diferentes modelos celulares por ejemplo células provenientes de pacientes con FRDA,

células de modelos animales o células que han sido manipuladas con secuencias de RNA de interferencia para disminuir los niveles de frataxina.

Se han logrado muchos avances con la ayuda de modelos simples, como por ejemplo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la mosca *Drosophila melanogaster* o el gusano *Caenorhabditis elegans*. En un primer momento, se utilizó la levadura para mostrar que tanto la frataxina como su ortólogo en levaduras Yfh1 se localizaban en la matriz mitocondrial. Además ambas proteínas eran funcional y estructuralmente homologas (Babcock et al, 1997). Este modelo también ha sido empleado para estudiar el papel de la frataxina en la regulación y tráfico intracelular del hierro, la biogénesis de los centros Fe-S así como en el metabolismo celular (Puccio, 2009). Por otra parte, modelos en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* basados en la tecnología de interferencia son de mucha utilidad para estudios de modificadores genéticos (Vazquez-Manrique et al, 2006).

En lo que respecta a modelos multicelulares, se han desarrollado muchos modelos murinos que aportan conocimiento sobre la cascada de eventos asociados a la FRDA. El grupo de Hélène Puccio desarrolló un primer modelo murino para esta enfermedad basado en el modelo clásico de delección de frataxina. Este modelo resultó letal en la etapa embrionaria. Es por esto que se desarrollaron otros mutantes condicionales para diferentes tejidos. Este mismo grupo generó otras dos líneas: la primera tiene la recombinasa CRE bajo el promotor neuronal enolasa específica neuronal (NSE del inglés, *neuron-specific enolase*), y la segunda bajo el promotor creatina quinasa de músculo (MCK del inglés, *muscle creatine kinase*). Estos animales recapitulan muchos de los síntomas de la patofisiología de la enfermedad (Puccio et al, 2001). Adicionalmente, para evitar la falta de frataxina neuronal durante el desarrollo se generó un ratón inducible por tamoxifeno bajo el promotor de la proteína murina de prión. Éste permitió ver rasgos neurológicos, sensoriales e histológicos muy similares a los de los pacientes (i.e. que las anomalías observadas en los DRGs son un evento primario mientras que la pérdida neuronal en las columnas de Clark y la degeneración en la columna posterior de la espina dorsal son eventos secundarios) (Simon et al, 2004). Por último, la delección de frataxina en las células β del páncreas permitió conocer la relación entre FRDA y diabetes (Ristow et al, 2003).

A pesar de que los modelos condicionales murinos son de mucha utilidad, muchas veces no imitan correctamente la enfermedad. Es por eso que el grupo de Pandolfo desarrolló modelos basados en la inclusión de repeticiones GAA dentro del gen murino. El primero de estos contiene 230 repeticiones de GAA en el intrón 1 de la frataxina bajo un fondo nulo para la frataxina murina.

Estos ratones *knock-in/knock-out* tienen un 25%-35% de frataxina pero sin anomalías en la coordinación motora, en el metabolismo del hierro o en la respuesta a los depósitos de hierro (Miranda et al, 2002). El ratón *knock-in/knock-in*, que es homocigoto para el alelo que contiene las repeticiones GAA, tampoco manifiesta la patología, aunque ha sido de utilidad para estudiar los cambios epigenéticos asociados con las repeticiones y correlacionarlos con la expresión de frataxina (Rai et al, 2008).

Finalmente, el grupo de Pook generó un modelo murino humanizado. Este es un ratón transgénico que carece de frataxina murina pero que en cambio contiene un cromosoma artificial de levadura (YAC del inglés, *yeast artificial chromosome*) con el gen entero de la frataxina humana derivado de pacientes de FRDA (Al-Mahdawi et al, 2004; Al-Mahdawi et al, 2006, De Biase et al, 2007). Estos ratones tienen bajos niveles de frataxina en todo el cuerpo y síntomas más parecidos a los visto en la clínica. A diferencia de los generados por el grupo de Pandolfo, estos sí presentan un fenotipo con una neurodegeneración progresiva y deficiencias en la capacidad motora del animal. Este fenotipo tipo FRDA es bastante moderado y no presenta una ataxia propiamente dicha ni tampoco una reducción en la esperanza de vida.

OBJETIVOS

La presente tesis tiene como objetivo general estudiar la posible relación entre el IGF-I y la ruta patogénica de la ataxia de Friedreich, la más común de las ataxias hereditarias. Para esto, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar los efectos de la falta de frataxina en neuronas y astrocitos.
2. Estudiar el impacto del IGF-I sobre células que carecen de frataxina.
3. Determinar en su caso, la ruta de acción del IGF-I.
4. Evaluar al IGF-I como potencial agente terapéutico para la ataxia de Friedreich.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e iluminación controlada, con ciclos alternativos de 12 horas de luz y oscuridad, y con comida y agua administradas *ab libitum*. El número y sufrimiento de los animales se minimizó siguiendo la normativa de la Unión Europea 86 / 609 / EEC, y fueron manejados de acuerdo a los procedimientos del real decreto 223 / 1988 del 14 de marzo sobre protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos (BOE nº 67 de marzo de 1988, pp. 8509-8512). Verificamos diariamente el genotipo de los diferentes animales transgénicos. Además, realizamos la extracción de DNA de la cola del ratón con protocolos estándares y determinamos el genotipo usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los animales que utilizamos fueron:

- Ratones C57BLACK6 (abreviada como C57BL/6) como cepa control
- Ratones *knockout* condicionales de Ataxia de Friedreich

El grupo de Hélène Puccio generó un modelo knockout condicional basado en el sistema Cre-loxP, ya que en el modelo clásico de delección de frataxina por recombinación homóloga el embrión es letal a los pocos días de implantación. Estos ratones se caracterizan por tener el exón 4 del gen de la frataxina flanqueado por secuencias LoxP (también denominado *floxeado*). La expresión de la recombinasa Cre dentro de la célula posibilita la recombinación entre las dos secuencias LoxP y por tanto la eliminación de la secuencia entre estas regiones. La delección de esta región se traduce en una proteína no funcional.

La colonia de ratones se genotipó utilizando los siguientes oligonucleótidos: Fwd (5'→3') CTG TTT ACC ATG GCT GAG ATC TC, Rev (5'→3') CCA AGG ATA TAA CAG ACA CCA TT y Rev KO (5'→3') CGC CTC CCC TAC CCG GTA GAA TTC. El primer par de oligonucleótidos da un fragmento de 250 pares de bases, mientras que los oligonucleótidos Fwd y Rev KO dan un producto de 499 pares de bases.

- Ratones knockout de frataxina bajo el promotor GFAP (FAsKO – *frataxin astrocyte knockout mice*)

Generamos la colonia mediante el cruce de ratones *knockout* condicionales (*floxeados*) para Ataxia de Friedreich con otra cepa de transgénicos que expresa la recombinasa CRE

bajo el promotor GFAP humano (Jackson Laboratory). Estos animales son deficientes para frataxina únicamente en astrocitos, lo cual permite evaluar el rol de la frataxina en estas células.

Así mismo, para comprobar que la escisión de la frataxina se daba únicamente en los astrocitos, realizamos un cruce del ratón cre recombinasa bajo el promotor GFAP con el ratón ROSA eYFP. Este ratón tiene la proteína fluorescente amarilla mejorada (eYFP; *enhanced yellow fluorescent protein*) bajo el locus Gt(ROSA)26S; la expresión eYFP está bloqueada por una secuencia LoxP que flanquea a una secuencia *stop* ubicada por encima del eYFP. Cuando este ratón se cruza con un ratón que tiene la recombinasa cre bajo un promotor específico, se corta la secuencia stop en el tipo celular específico, y se observa la expresión de eYFP. En la **figura 5** se muestra el marcaje amarillo restringido a astrocitos del ratón resultante del cruce del ratón Rosa eYFP con cre recombinasa bajo el promotor GFAP, confirmando la especificidad del sistema GFAP-CRE.

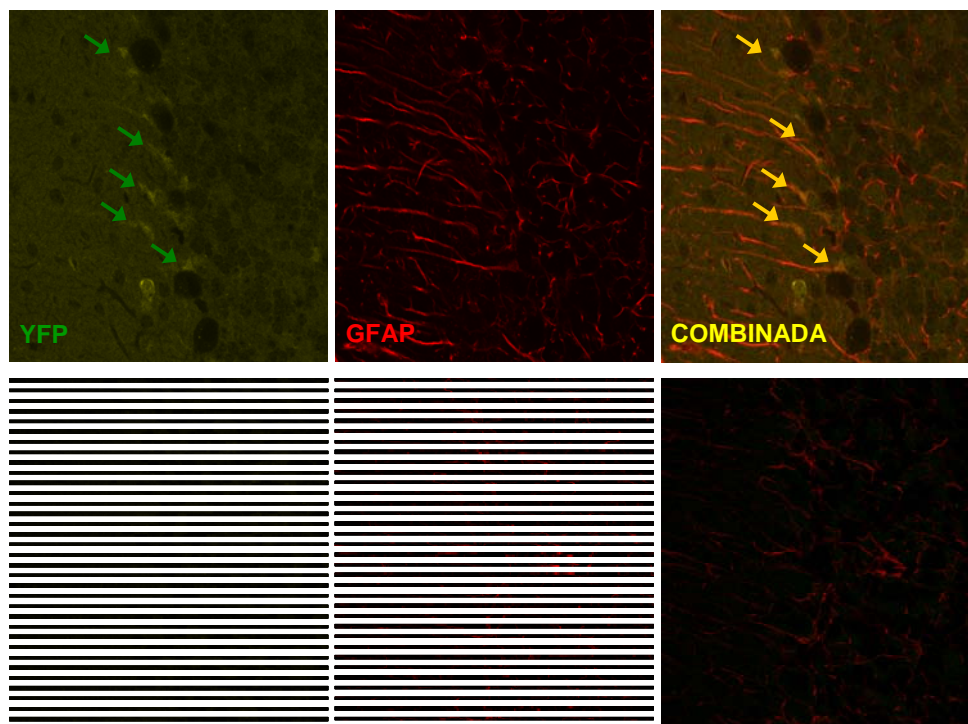


FIGURA 5. La expresión de eYFP se encuentra restringida a los astrocitos en ratones doble mutantes Lox.eYFP-GFAP.Cre. Los paneles superiores corresponden a cortes del ratón GFAP - Rosa eYFP, mientras que los inferiores a un ratón control. Se muestra el marcaje con YFP y GFAP así como la combinación de ambos.

Para verificar el genotipo de estos ratones, usamos los oligonucleotidos Fwd (5'→3') ACT CCT TCA TAA AGC CCT y Rev (5'→3') ATC ACT CGT TGC ATC GAC CG que amplifican una banda de 190 pares de bases para el transgén de la recombinasa CRE. También realizamos la PCR anteriormente descrita para los ratones *knockout* condicionales para Ataxia de Friedreich.

- Ratones B6.Cg-*Fxn*^{tm1Mkn} Tg(FXN)YG8Pook (YG8R)

El grupo del Dr. Pook ha generado recientemente un ratón doble transgénico usando la metodología YAC. Para ello, en breve, insertaron un transgén de 370kb dentro de un YAC, que incluye el gen completo de la frataxina humana con 2 secuencias de repeticiones GAA en tandem, una de 82 y la otra de 190. El YAC fue introducido en oocitos de una ratona gestante por medio de microinyecciones y se estableció la línea progenitora. Estos ratones, a su vez, fueron cruzados con ratones *knockout* condicionales (*floxeados*) de Ataxia de Friedreich para generar los doble mutantes.

Los ratones homocigotos para el alelo de la frataxina murina y hemocigotos para el transgén presentan un fenotipo de neurodegeneración progresiva, con déficits motores moderados, defectos en la actividad de la aconitasa y aumento en niveles de estrés oxidativo, entre otras características.

Para determinar el genotipo de estos animales, usamos los oligonucleotidos descritos anteriormente para los ratones condicionales de FRDA, así como los oligonucleotidos Fwd (5'→3') GGG ATT GGT TGC CAG TGC TTA AAA GTT AG y Rev (5'→3') GAT CTA AGG ACC ATC ATG GCC ACA CTT GCC para el alelo Tg(FXN)YG8POOK, que genera una banda de 720 pares de bases.

Se usaron ratones de diferentes edades dependiendo del experimento:

- Postnatales de 7 días (P7) usados para realizar cultivo primario de neuronas
- Postnatales de 4 días (P2-P4) para cultivo primario de astrocitos
- Postnatales de 0 días (P0) para cultivo primario de cardiomiocitos

2. Materiales y Reactivos

Disolvimos el IGF-I (ProSpec-Tany) en ácido acético 1N a una concentración final de 10mM y lo conservamos a -20°C hasta su uso. La Cloroquina (Sigma) fue disuelta en agua a una concentración de 100mM y almacenada a -20°C protegida de la luz hasta su uso.

Los diferentes compuestos inhibitorios utilizados en esta tesis se describen en la **tabla 1**.

Tabla 1: Compuestos Inhibitorios

Compuesto	Concentración	Función	Casa Comercial	Almacenaje
Actinomicina D	2 µg/ml	Inhibidor de la transcripción	Sigma-Aldrich	DMSO y almacenada a -20°C
Ciclohexamida	1µg/ml	Inhibidor de la síntesis de proteínas	Calbiochem	DMSO y almacenada a 4°C
Ly 294002	100 µM	Inhibidor de fosfotidilinositol 3 kinasa	Calbiochem	DMSO y almacenada a -20°C protegida de la luz
MG-132 carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal	10 µM	Inhibidor del proteosoma	Calbiochem	DMSO y almacenada a -20°C
Rapamicina	100nM	Inhibidor de mTOR	Sigma-Aldrich	DMSO y almacenada a -20°C
Ro 31 8220 (bisindolilmaleimida)	1 µM	Inhibidor de PKC	Calbiochem	DMSO y almacenada a -20°C

3. Anticuerpos

En la **tabla 2** se muestran los anticuerpos empleados, la inmunorreactividad, la casa comercial de procedencia y la dilución a la que fueron utilizados.

Tabla 2: Anticuerpos

Anticuerpo	Inmunoreactividad	Casa Comercial	Dilución
β-actina	Ratón	Sigma	1:50 000
β3tubulina	Ratón	Promega	1:5000
Aconitasa 2	Conejo	Sigma	1:2000
AKT 1/2(H136)	Conejo	Santa Cruz	1:1000
Calbindina	Ratón	Swan	1:5000

Frataxina (H-155)	Conejo	Santa Cruz	1:1000
GFAP	Conejo	Dako	1:5000
GFP	Conejo	Invitrogen	1:1000
IGF-I Receptor	Conejo	Santa Cruz	1:1000
mTOR	Conejo	Cell Signaling	1:2000
NeuN	Ratón	Chemicon	1:1000
pAKT (Ser473)	Conejo	Cell Signaling	1:2000
PGC-1	Conejo	Santa Cruz	1:1000
pIGF-I Receptor	Conejo	Cell Signaling	1:1000
pmTOR	Conejo	Cell Signaling	1:2000
Recombinasa Cre	Conejo	Novagen EMD Biosciences, Inc;	1:10,000
SOD1 [Cu-Zn]	Conejo	Stressgen	1:2000
SOD2 [Mn]	Conejo	Stressgen	1:5000
Vimentina	Conejo	Abcam	1:2000

4. Construcciones plasmídicas

Obtuvimos el DNA mediante transformación de bacterias *E. coli* competentes de la estirpe DH_{5α}, según Sambrook, 1989. Produjimos los plásmidos creciendo las bacterias en cultivo de Luria Bertani (LB) con antibiótico para seleccionarlás (Ampicilina o Kanamicina). La purificación del DNA plasmídico se realizó usando “Illustra plasmidPrep Midi Flow Kit” (GE Healthcare) o “QIAfilter plasmid maxi kit” (QIAGEN). Finalmente, cuantificamos el DNA en un NanoDrop ND-1000.

En la **tabla 3** se muestran los plásmidos que se utilizaron, así como la función que cumplen y su referencia de origen.

Tabla 3: Plásmidos

Plásmido	Utilización	Referencia y Origen
pEGFP-N1	Plásmido que controla la expresión de la proteína GFP bajo el control del promotor de CMV	Clontech
pEGFP-C1-CRE	Plásmido que controla la expresión de la recombinasa y la proteína GFP bajo el control del promotor CMV	Cedido por Dr. Alfredo Martínez (Instituto Cajal)
pMD2VSV.G	Plásmido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la envoltura heteróloga del vector; en concreto, la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV).	Cedido por Dr. Díaz-Nido (Universidad Autónoma de Madrid – CBM)
pCMV-dR8.74	Plásmido que aporta en <i>trans</i> todo los elementos necesarios para el empaquetamiento de los vectores virales	Cedido por Dr. Díaz-Nido
Mission® turbo GFP (SHC0003V)	Plásmido que contiene el gen que codifica para TurboGFP bajo el promotor de CMV.	Sigma-Aldrich
Mission® Non-target shRNA (SHC002)	Plásmido que porta la secuencia de interferencia <i>scramble</i> o aleatoria bajo el promotor U6	Sigma-Aldrich
Mission® shRNA Frataxina (NM_000144)	Plásmido que codifica para la molécula de RNA de interferencia contra el gen de la frataxina murina (clon 3-796s1c1) bajo el promotor U6	Sigma-Aldrich

5. Generación y empaquetamiento de vectores virales

Los vectores que se emplearon en esta tesis son lentivirus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1). Los diferentes plásmidos se encuentran en la **tabla 3**. El protocolo de empaquetamiento esta basado en el método de Naldini (Dull et al, 1998; Follenzi y Naldini, 2002a y 2002b).

En síntesis, las células HEK293T/17 fueron sembradas 20 horas antes de la transfección en placas p100 a una densidad de 6×10^6 células / placa. Al día siguiente las sometimos a una triple transfección con los complejos DNA- fosfato cálcico. Antes de realizar la transfección, inhibimos la función lisosomal con cloroquina a una concentración final de 25 μ M.

Las cantidades de cada uno de los plásmidos usados fueron:

- 5 μ g del plásmido de interés a empaquetar (turbo GFP, shRNA *non-target* o shRNA Frataxina)
- 5 μ g de pCMV-dR8.74
- 2 μ g de pMD2VSV.G

Añadimos los plásmidos a una solución de cloruro cálcico 125mM y a una solución salina tamponada con HEPES (HBS 2X del inglés, *HEPES buffered saline*), pH 7,1; NaCl 280mM, HEPES 100 mM, NaHPO₄ 1,5mM) para formar los precipitados de fosfato cálcico-DNA. Esta solución se agregó a las placas para comenzar la producción de partículas virales. Después de 7 horas, cambiamos el medio de cultivo. Transcurridas 24 horas desde el momento de la transfección, recogemos el sobrenadante que contiene las partículas virales y se agrega medio nuevo. Este proceso se repite durante tres días consecutivos. El medio con las partículas virales fue filtrado (0.45 μ m) para evitar que restos celulares puedan afectar la infección. Finalmente, éste fue alicuotado y guardado a -80 °C hasta su uso.

6. Cultivos celulares primarios

6.1 Cultivo de neuronas granulares de cerebelo

El cultivo primario de neuronas de células granulares de ratón presentó una pureza superior al 99% (células β 3-tubulina positivas) y se realizó de acuerdo a lo descrito por Gonzalez et al, 2001. En breve, sacrificamos ratones posnatales de 7 días (P7) por decapitación, diseccionamos los cerebelos en tampón salino equilibrado (EBSS del inglés, *equilibrated balance salt solution*, GIBCO BRL) y retiramos meninges y vasos sanguíneos cuidadosamente. Una vez que los cerebelos estuvieron limpios, porcedimos a una primera disgregación mecánica con la ayuda de un bisturí. Luego, llevamos a cabo la disgregación celular en una solución de papaína activada (Worthington) y DNAsa (Sigma) en una atmósfera saturante de carbógeno; esta última se realizó durante 1 hora con agitación constante (220 rpm) a 37°C. La disgregación se detuvo al centrifugar las células por un gradiente de ovomucoide (inhibidor de papaína), según las instrucciones del fabricante (Worthington).

Sembramos la suspensión celular resultante sobre superficies recubiertas con gelatina/poli-L-lisina (1µg/ml) en un medio compuesto por Neurobasal (Gibco) suplementado con B27 (Gibco), 4mM de glutamina (Sigma) y 18mM de KCl (Merk). Se sembraron $1,5 \times 10^6$ células por pocillo en placas de 6 y $4,5 \times 10^5$ células por pocillo en placas de 12. Las células fueron usadas a diferentes tiempos, dependiendo del experimento.

6.2 Cultivo de astrocitos de telencéfalo

El cultivo de astrocitos primario tuvo una pureza superior al 95% (células GFAP positivas) y se preparó siguiendo lo descrito por Fernández et al, 2007. Sacrificamos los ratones (P2-P4) por decapitación y después, con la ayuda de una lupa, extrajimos el telencéfalo en EBSS. Eliminamos las meninges y procedimos a una disgregación mecánica con ayuda de una pipeta Pasteur. La suspensión celular resultante se centrifugó y resuspendió en DMEM-F12 con 10% de suero fetal bovino (FBS del inglés, fetal bovine serum) y 100mg/ml de antibiótico/antimicótico (Ab/Am) para sembrarse en un frasco de 75mm². Mantuvimos el cultivo cambiando el medio una vez por semana hasta que las células se encuentren confluentes. Una vez que las células están confluentes, se eliminan los oligodendrocitos y la microglia mediante agitación a 280rpm por 16h a 37 °C y se retira el sobrenadante que los contiene. Finalmente, los astrocitos son tripzinizados y plaquedados a la concentración requerida para los posteriores experimentos.

6.3 Co-cultivo de neuronas granulares con astrocitos de telencéfalo

Los astrocitos primarios obtenidos como se describe en el apartado anterior se sembraron sobre placas recubiertas con gelatina/poli-L-lisina y esperamos a que alcancen una confluencia del 60%. Después, quitamos el medio y sembramos sobre los astrocitos las neuronas primarias resuspendidas en DMEM/F12 suplementado con B27, 4mM de glutamina y 25mM de KCl.

6.4 Cultivo de Cardiomiocitos

Preparamos el cultivo de cardiomiocitos de ventrículos de ratones neonatales siguiendo lo descrito por Brooks G et al, 1997. Sacrificamos un mínimo de 20 ratones P0 por decapitación. Extrajimos los corazones y, con la ayuda de una lupa, limpiamos los ventrículos en HBSS con heparina. Los ventrículos fueron disociados por digestiones enzimáticas seriadas (5 digestiones de 10 minutos cada una) con 24 mg de colagenasa tipo II (GIBCO) y 50 µg de DNAsa (Sigma) en 50 mL en HBSS, usando un agitador a 210rpm a 37°C. Por medio de una siembra preliminar de 30 minutos, separamos los miocitos de los fibroblastos. Las células no adheridas fueron resuspendidas en un medio que contenía 4:1 DMEM con alto contenido en glucosa (GIBCO) :

M199 (GIBCO), 10% suero de caballo, 5% FBS, y 100 mg/mL antibiotico-antimicótico (Sigma). Las células aisladas se sembraron a 5×10^5 células por cm^2 .

6.5 Cultivo de neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal

El cultivo primario de DRGs de ratón presentó una pureza superior al 90% y se realizó de acuerdo a lo descrito por Davies et al, 1993. En síntesis, sacrificamos ratones postnatales de 7 días (P7) y diseccionamos y limpiamos aproximadamente 40 DRGs por animal en L15 (Gibco). Una vez que los DRGs estuvieron limpios, realizamos una disgregación enzimática a 37°C utilizando primero colagenasa 2mg/ml, seguido por 0,05% de tripsina y finalmente DNAsa al 1%. Por último, llevamos a cabo una disgregación mecánica con pipeta Pasteur. La suspensión celular resultante se sembró sobre superficies recubiertas con laminina (20µg/ml) en un medio compuesto por F12 (Gibco) suplementado con Albumax II (Gibco), 2 mM glutamina, 0,35% de albúmina de suero bovina, 60 ng/ml de progesterona, 16g/ml putrescina, 400 ng/ml de L-tiroxina, 38 ng/ml de selenita de sodio, 340 ng/ml de triyodotironina, 60 mg/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomicina. Sembramos aproximadamente 2000 neuronas por mililitro en pocillos de placas de 24.

7. Experimentos “in vitro”

Las células utilizadas provenían de las diferentes cepas de ratón. Las células provenientes de los ratones condicionales de FRDA se transfectaron con los plásmidos: peGFPC1-CRE recombinase o pCMV-GFP. En el caso de los cultivos celulares de los ratones C57BL6, las células fueron infectadas con partículas lentivirales que codificaban para el interferente de frataxina, o para la secuencia *scramble*, o para el plásmido GFP. Las células de ratones FASKO y C57BL6 fueron utilizadas directamente.

7.1 Transducciones con vectores lentivirales

Realizamos las infecciones en astrocitos y neuronas. En estos experimentos utilizamos interferentes de frataxina comerciales (Mission® shRNA – Sigma).

En el caso de los astrocitos, añadimos 250µl del sobrenadante viral en un volumen final de 0,5 ml por pocillo de 12. Después de 18 horas, retiramos el medio que contenía los virus y agregamos medio nuevo. Pasados 4 días del momento de la infección, procedimos a seleccionar las células transducidas mediante la adición de 3 µg/ml de puomicina. Las células fueron empleadas para realizar experimentos a partir del día 10 *post* infección.

Después, determinamos el porcentaje de astrocitos que fue transducido con el sobrenadante viral. Para facilitar este proceso, utilizamos las células infectadas con el shRNA GFP, y en éstas calculamos el número de células GFP⁺, midiendo la fluorescencia de las mismas por citometría de flujo. Los astrocitos mostraron ser células fácilmente transducibles con este tipo de vectores virales, ya que obtuvimos una eficiencia cercana al 75%.

En el caso de las neuronas, añadimos 200µl del sobrenadante viral en un volumen final de 0,5 ml por pocillo de 12. Pasadas 18 horas de la infección, cambiamos el medio con el sobrenadante viral por medio fresco. Los experimentos se realizaron a los 3 días de la infección y en el caso de las neuronas no se realizó una selección de las células transducidas. Determinamos si las neuronas son células fácilmente transducibles. Esto lo realizamos utilizando el control shRNA GFP. Aproximadamente el 70% de las neuronas fueron GFP positivas al ser medidas por citometría de flujo.

7.2 Transfecciones

Se estableció un modelo de deficiencia de frataxina *in vitro* basado en la eliminación de este gen mediante transfecciones con la recombinasa CRE en células provenientes de ratones Lox FRDA. El agente transfectante fue diferente de acuerdo al tipo celular. Los cultivos astrocitarios fueron transfectados con FuGENE HD (Roche) usando el ratio 3:1 (µl del agente de transfección vs. µg de DNA del plásmido) al alcanzar una confluencia del 70%. Las neuronas fueron transfectadas con Neurofect (Genlantis) 24 horas después de la siembra (antes de que presentaran proyecciones) usando un ratio de 6:1. El porcentaje de transfección fue de 40% en astrocitos y 30% en neuronas. Utilizamos los agentes transfectantes y los ratios en los que obtuvimos una mayor eficiencia de transfección para cada estirpe celular.

7.3 Experimentos de estimulación con IGF-I

Antes de realizar los experimentos de estímulo con IGF-I, ayunamos las células retirando el FBS del medio. El tiempo de ayuno varió de acuerdo a la estirpe celular: 3 horas para astrocitos y 2 horas para cardiomiocitos y neuronas. Transcurrido este tiempo, realizamos la estimulación con IGF-I 100nM. En los experimentos en que se usaron inhibidores, éstos (ciclohexamida 1µg/ml, actinomicina D 2µg/ml, MG-132 10µM, rapamicina 100nM or LY294002 100µM) se añadieron 3 horas antes de la adición del IGF-I. Salvo que se indique lo contrario, las células fueron estimuladas durante 24 horas con IGF-I. Por último, procesamos las células de acuerdo al tipo de análisis que se iba a realizar.

8. Experimentos “in vivo”

8.1 Administración crónica de IGF-I

El tratamiento crónico con IGF-I humano (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$) se realizó durante 4 semanas a ratones YG8R. Utilizamos bombas osmóticas (Alzet) del modelo 1004, las que tienen una tasa de liberación de 0,11 $\mu\text{l}/\text{hora}$. Estas bombas fueron implantadas subcutáneamente a ratones anestesiados con IsoFluorano. El IGF-I se administró disuelto en solución salina al 0,9%. El grupo de animales control tratados con bombas osmóticas con salino fue omitido basándose en numerosos estudios previos demostrando la falta de efectos observables (Fernández et al, 1998) y el elevado coste de las minibombas Alzet.

El día 28 post implantación de las bombas, realizamos una prueba para determinar su coordinación motora: Rotarod con aceleración constante el cual se detalla a continuación.

8.2 Evaluación de la coordinación motora

El rotarod (Ugo-Basille 7650) es un aparato diseñado para analizar la coordinación motora en roedores. La prueba consiste en colocar al animal sobre un rodillo giratorio donde la velocidad de rotación se aumenta gradualmente y se registra el tiempo que el animal es capaz de mantenerse sobre el rodillo sin caerse. Los ratones YG8R tratados y sin tratar con IGF-I fueron evaluados usando el protocolo previamente descrito por el grupo de Pook (Al-Mahdawi et al, 2006). En síntesis, el día previo a la realización del experimento, los ratones fueron familiarizados con el aparato. El día de la prueba se realizó 4 ensayos; en cada uno de estos la velocidad de rotación aumentó gradualmente de 4 a 40 rpm durante 5 minutos y el ratón tuvo 10 minutos de descanso entre ensayos. Finalmente, se registró el tiempo que tarda el animal en caer del rodillo.

8.3 Obtención de muestras biológicas

Extrajimos sangre por punción cardiaca en el momento previo al sacrificio del animal. El animal fue perfundido con 50 ml de tampón salino 0,9 N y se extrajeron: hemisferios, cerebelo, corazón e hígado y estos tejidos fueron guardados a -80°C hasta ser procesados.

En el caso que las muestras se usaron para histoquímica, después que los ratones fueron perfundidos con solución salina, éstos fueron perfundidos con paraformaldehído 4% (PFA). Una vez terminada la perfusión, extrajimos el cerebro y se incubó en PFA 4% durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente.

8.3.1 Extracción del suero

La sangre obtenida se dejó reposar a 4°C durante 2 horas, posteriormente se centrifugó a 4 °C a 5.000 RPM durante 15 minutos. Al finalizar la centrifugación se recogió el suero del sobrenadante y se congeló a -20 °C hasta su utilización.

8.4 Administración de microesferas de IGF-I y evaluación de la supervivencia de los FAsKO

Llevamos a cabo el tratamiento con microesferas con IGF-I humano (50 µg/Kg.día) en ratones FAsKO a día postnatal 7. Las microesferas se preparon según lo descrito anteriormente (Carrascosa et al, 2004). Inyectamos las microesferas en solución salina 0,9% a través de una jeringa de 23G. Repetimos la inyección de microesferas 10 días después de la primera inyección y continuamos con el mismo procedimiento durante el tiempo de vida de los FAsKOs. Finalmente, utilizamos el estimador de Kaplan–Meier para realizar el análisis de supervivencia.

9. Ensayos celulares

9.1 Determinación de la viabilidad neuronal en co-cultivos con astrocitos

Sembramos astrocitos (apartado 6.2) sobre cubreobjetos de 22mm de diámetro recubiertos con gelatina/poli-L-lisina (1µg/ml), y una vez que estos habían adquirido una confluencia del 60% se añadieron las neuronas previamente transfectadas por electroporación. Para ello, previamente realizamos un cultivo primario de neuronas (apartado 6.1) que se nucleoporaron con 2µg de DNA utilizando la tecnología AMAXA (kit *Basic Nucleofector® - Primary Mammalian Neurons*; programa G13). Tras 24 horas, los cultivos se estimularon con IGF-I 100nM. Antes de proceder a la cuantificación de las neuronas GFP⁺, llevamos a cabo una contratinción nuclear (DAPI). Se tomaron fotos de 10 campos con el objetivo de 10x por cada pocillo utilizando un microscopio de fluorescencia Leica CTR 6000. La cuantificación se realizó mediante el software MetaMorph (Molecular Devices) con el módulo “*multi wavelength cell scoring*” y los resultados se expresaron como porcentaje de células GFP⁺ relativizadas contra el control.

9.2 Determinación de los niveles de estrés oxidativo

Para evaluar la producción de radicales libres de oxígeno, efectuamos 2 métodos: el primero con la sonda 2,7 Diclorodihidrofluoresceína diacetato - H₂DCFDA (Molecular Probes) que reconoce el H₂O₂; y el segundo con el kit MitoSOX Red (Molecular Probes), que reconoce el anión superóxido.

9.2.1 MitoSox Red

La sonda de MitoSox Red se dirige rápida y selectivamente a la mitocondria. Una vez allí es oxidada por el anión superóxido lo cual genera una posterior emisión de fluorescencia. El estrés oxidativo en este caso fue medido por citometría de flujo, siguiendo el protocolo de la casa comercial. En síntesis, incubamos las células con la sonda a una concentración de 5 μ M durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, levantamos las células con un tratamiento con tripsina 0,05%. Después de centrifugar y re-suspender las células, las analizamos con un citómetro de flujo FACS Aria I (BD Biosciences, San Diego, CA). El fluoróforo fue excitado con el láser 488nm y el filtro de emisión fue el 585/42 BP (FL2). Los fragmentos celulares y dupletes fueron excluidos del análisis. Finalmente, analizamos los datos con el software FACSDiva (BD Biosciences); los resultados que se muestran corresponden al incremento de la absorbancia total (la absorbancia obtenida de todas las células positivas) con respecto al control.

9.2.2 2,7 Diclorodihidrofluoresceína diacetato

El H₂DCFDA es un compuesto orgánico no fluorescente que en presencia de esterasas y de H₂O₂, y mediante un proceso combinado de hidrólisis y oxidación, libera los grupos acetato y se convierte en Diclorofluoresceína (DCF) (Brera et al., 2000). La DCF es una sustancia muy fluorescente que se excita a una longitud de onda de 485nm y emite a 520nm. En resumen, las células fueron lavadas y luego incubadas con 50 μ M DCFDA durante 50 minutos a 37°C protegidas de la luz. Pasado este tiempo, retiramos el exceso de sonda mediante lavados, y al final, las placas fueron leídas en un lector de placas FLUOstar (Labtechnologies BMG, Offenburg, Alemania). Los resultados son expresados como el incremento de la absorbancia con respecto al control.

9.3 Determinación de la viabilidad celular y función mitocondrial

Para determinar la función mitocondrial y por ende de viabilidad celular, utilizamos el ensayo de conversión del reactivo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio). Este método se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color púrpura (formazán) (López-López et al, 2004). En resumen, añadimos una solución acuosa de MTT a los cultivos a 10 μ M e incubada 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células fueron desnaturalizadas con NaOH 0,1N en 50% de metanol para promover la disolución de los cristales de formazán. Medimos la absorbancia de esta solución a 595 nm en un lector de placas Fluostar, y

expresamos los resultados obtenidos fueron como el incremento de la absorbancia respecto al control.

10. Inmunoensayos

10.1 Western blot

Homogenizamos las muestras de tejido almacenadas a -80°C en PBS. La cantidad de proteínas total se calculó usando el método colorimétrico de Bradford (Biorad), el que se realizó siguiendo el protocolo comercial.

Lavamos las placas de células con tampón fosfato salino (PBS) y las lisamos por un choque osmótico incubando las placas durante 10 minutos a 4°C en tampón de lisis. El tampón de lisis está compuesto por: 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM Cl_2Ca , 1mM Cl_2Mg , 1% glicerol, 1%NP-40, 1ug/ml aprotinina, 1ug/ml leupeptina, 400 uM ortovanadato de sodio y 200 mM fluoruro de fenilmetil sulfonyl (PMSF).

En el caso de las muestras de tejido, cargamos 50ug de proteína mezclados con tampón desnaturante (10%SDS, 50% glicerol, 500 mM DTT, 375 mM Tris pH6,8 y 0,1% azul de bromofenol) en cada carril del gel de electroforesis. Para las células, las muestras de un pocillo fueron recogidas con la ayuda de un raspador y mezcladas con tampón desnaturante. Una vez obtenida la muestra con el tampón desnaturante este se hirvió a 100 °C durante 5 minutos y fue cargada en geles del 8-15% de acrilamida-bisacrilamida (Laemmli, 1970) dependiendo del peso molecular de la proteína de interés. Las proteínas desnaturadas fueron separadas según su peso molecular mediante un sistema de electroforesis, Mini-Protean 3 (BioRad, Hercules, CA, EEUU), luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Protran, Whatman, Sanford, ME, EEUU). Bloqueamos las membranas en una solución de leche desnatada al 5% en tampón tris salino con tween-20 al 0,05% (TTBS). Éstas fueron incubadas en agitación con el anticuerpo primario diluido en TTBS durante toda la noche a 4°C o tres horas a temperatura ambiente. Después, incubamos las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado a peroxidasa una hora a temperatura ambiente. Finalmente, visualizamos la inmunoreactividad de las proteínas mediante un sistema de quimioluminiscencia (*Enhanced Chemiluminescences Detection System*, ECL, PerkinElmer Life Sciences, Boston MA, EEUU). Las bandas fueron cuantificadas en un densitómetro calibrado GS-800 (BioRad,) usando el programa *Quantity One* (BioRad) para hacer el análisis densitométrico. Los valores se normalizaron con los obtenidos con un anticuerpo control (β -actina) para corregir las variaciones en la cantidad total de proteína cargada entre los diferentes pocillos.

10.2 ELISA de IGF-I humano y murino

Para la detección de IGF-I humano y de ratón, utilizamos el kit de ELISA comercial Quantikine (R&D Systems) específico para cada especie. El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La sensibilidad de detección del ensayo es 0,007-0,056 ng/mL para el IGF-I humano y 1,6-8,4 pg/mL. Los valores de concentración de IGF-I obtenidos se normalizaron por el volumen de suero utilizado o por la cantidad de proteína total del tejido. Los ratones YG8R tratados crónicamente con IGF-I humano tienen $22,1 \pm 1,26$ ng/ml de IGF-I sérico. Los YG8R controles, como era de esperar, presentaron niveles indetectables de IGF-I humano.

10.3 Inmunocitoquímica

Los ensayos de inmunocitoquímica por inmunofluorescencia se llevaron a cabo tanto en células como en tejidos. Plaqueamos las células sobre cubreobjetos de 22mm de diámetro recubiertos con gelatina/poli-L-lisina (1µg/ml), y las fijamos con PFA 4%.

Los cerebros que utilizamos fueron previamente extraídos y fijados con PFA 4% (apartado 8.3, obtención de muestras biológicas). Al día siguiente se retiró el cerebro de la solución fijadora y se lo colocó en PB. A lo largo de los 15 días siguientes, cortamos el cerebro en rodajas de 50 µm de grosor en un vibratomo estándar. Los cortes de interés fueron seleccionados y separados para su posterior uso.

El ensayo de inmunocitoquímica consiste en dos incubaciones, la primera con el anticuerpo primario, y la segunda con un anticuerpo secundario unido a una sonda fluorescente. Ambas incubaciones se realizan en un tampón: PB 0.1 M, Triton X-100, 0.1%, albúmina de suero bovino (BSA) 0,3%. La incubación con el anticuerpo primario se realiza durante toda una noche mientras que la del anticuerpo secundario fue de 2 horas. Los cortes fueron incubados con el colorante DAPI (200 ng/ml, Calbiochem) para obtener una contratinción nuclear. Los cortes fueron visualizados en un microscopio confocal y/o microscopio de epifluorescencia (Leica).

11. PCR cuantitativa (qPCR)

La técnica fue utilizada para cuantificar los niveles de RNA mensajero en astrocitos y en neuronas. Utilizamos células de cultivos primarios de astrocitos y neuronas provenientes de ratones C57BL6 tratados y sin tratar con 100nM IGF-I. Además, cuantificamos los niveles de mRNA procedentes de diferentes tejidos. La extracción de RNA total de $0,5-1,5 \times 10^6$ células se

realizó con el kit RNASpin Mini (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA se midió en el Nanodrop (ND-1000, Nanodrop Technologies Inc). Además, verificamos la integridad del mismo con un gel de agarosa al 1%. La transcripción reversa de 1ug de RNA se realizó con el kit *High Capacity cDNA reverse transcription* (Applied Biosystems, Austin, TX) para obtener el cDNA. Posteriormente, amplificamos 1µl de muestra de cDNA por qPCR usando las sondas TaqMan (descritas en la **tabla 4**; se muestra también la referencia de cada una), y como control endógeno se utilizó el GAPDH (Applied Biosystems). Cada muestra fue evaluada por triplicado en 20 µl de reacción usando la *Taqman Universal PCR Master Mix* siguiendo el protocolo comercial (Applied Biosystems). Utilizamos el equipo *ABIPrism 7500 sequence detector system* con el programa empleado para la qPCR: 50°, 2 minutos, 1 repetición; 95°, 10 minutos, 1 repetición; 95°, 15 segundos, 40 repeticiones y 60°, 1 minuto. A partir de la curva estándar, se obtuvo la concentración de las muestras de interés usando el método $2(-\Delta\Delta C(T))$, siguiendo lo descrito por Livak KJ and Schmittgen TD. Los resultados son expresados como el ratio del gen en estudio expresado en una muestra frente a un control en comparación con GAPDH (control endógeno).

Tabla 4: Sondas Taqman

Sonda	Referencia
Frataxina humana	Hs00175940_m1
Frataxina murina	Mm00784016_s1
GAPDH	Nm_002046.3
GPX2	Mm01286848_gH
IGF-I	Mm00439560_m1
IGF-I receptor	Mm00802831_m1
IGFBP5	Mm00516037_m1
MPP4	Mm00460874_m1

12. Array para genes de estrés oxidativo y respuesta antioxidante

El array de estrés oxidativo y respuesta antioxidante RT² Profiler™ PCR evalúa 84 genes relacionados con el estrés oxidativo (SABiosciences). Este se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el RNA, realizamos una transcripción reversa de 1ug de RNA con el kit *High Capacity cDNA reverse transcription* para obtener el cDNA. Posteriormente,

añadimos la muestra de cDNA al RT² master mix de SYBR green y se alicuotó la mezcla en la placa de 96. Utilizamos el equipo *ABI Prism 7500* con el programa empleado para la qPCR: 95°, 10 minutos y después 40 repeticiones de 95°, 15 segundos y 60°, 1 minuto. Analizamos los datos usando el método $2(-\Delta\Delta C(T))$, de SABiosciences.

(<http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>)

13. Análisis estadístico

Los valores promedios obtenidos que se presentan corresponden a la media aritmética, y las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Los resultados de este trabajo corresponden a un mínimo de 3 experimentos. No obstante, en cada caso se indica el número experimental (n). Los resultados de los experimentos obtenidos se analizaron con el programa GraphPad Prism dependiendo del número de grupos que se tenían. En el caso de tener solo dos grupos se utilizó una t de Student para comparar las dos medias, mientras que cuando hubo mas de dos, se analizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido del test no paramétrico, Bonferroni. El nivel de significación establecido fue * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

RESULTADOS

La falta de frataxina en FRDA afecta a todas las células del cuerpo aunque se manifiesta sobretodo como una enfermedad neurológica. Es por esto, que evaluamos la falta de frataxina en los dos tipos celulares más abundantes del sistema nervioso central: las neuronas y los astrocitos. Así mismo determinamos el efecto del IGF-I en ambos tipos celulares.

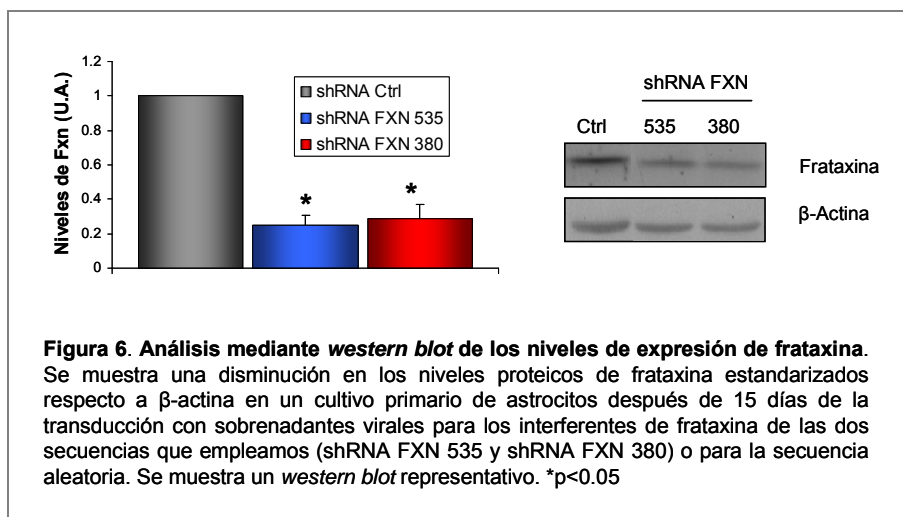
1. Generación de un modelo *in vitro* de falta de frataxina

Debido a que la disminución en los niveles proteicos de frataxina es el rasgo principal de esta enfermedad, a lo largo de esta tesis hemos utilizado dos aproximaciones *in vitro* con el fin de obtener una deficiencia de frataxina (Fxn) controlada. Esta situación intenta replicar lo que ocurre en los pacientes de FRDA. Estos tienen aproximadamente un 25% de esta proteína en comparación con personas sanas (Campuzano et al, 1997). El primer modelo consiste en células infectadas con interferentes de frataxina y el segundo son cultivos de células que tienen la frataxina flanqueado por secuencias LoxP, donde las células transfectadas carecen totalmente de esta proteína mientras que las no transfectadas presentan niveles normales de frataxina.

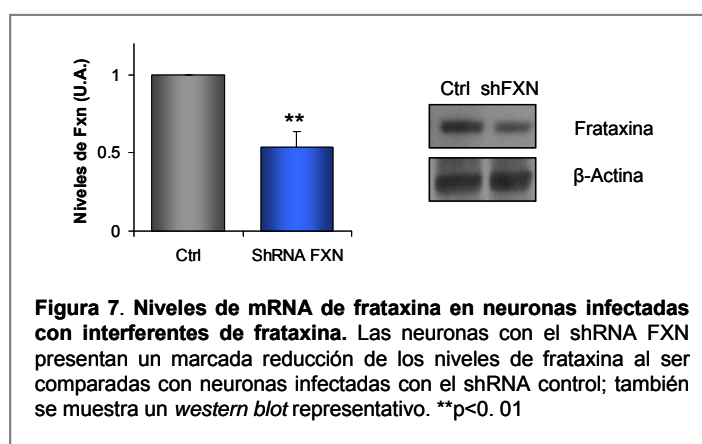
1.1 Transducción de células con interferentes murinos de frataxina

En este caso partimos de un cultivo primario sean astrocitos o neuronas de ratón C57BL6, los cuales fueron posteriormente infectados con partículas lentivirales. Utilizamos interferentes para frataxina y dos controles. El primero es una secuencia desordenada la cual no hibrida con ningún RNA mensajero (mRNA) celular mientras que el segundo control es una secuencia que codifica para la proteína GFP lo cual nos permite evaluar el porcentaje de células que han incorporado el virus. En los experimentos que mostramos a continuación utilizamos como control la secuencia desordenada, a la cual denominamos shRNA control a lo largo de este trabajo.

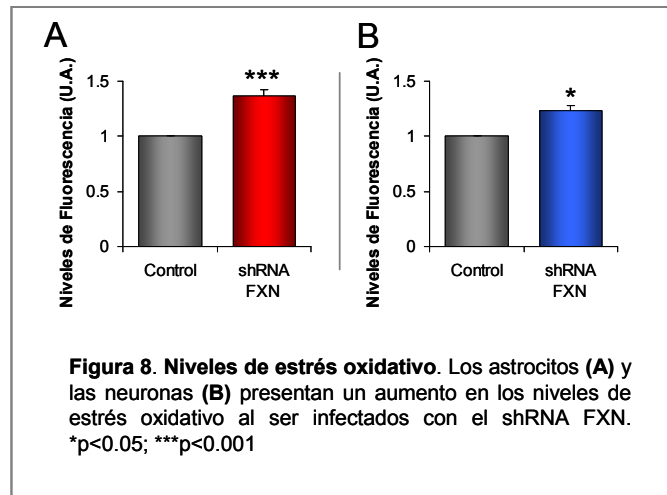
Evaluamos si el interferente de frataxina funcionaba correctamente en astrocitos, es decir si disminuía los niveles proteicos de frataxina en los astrocitos infectados con el shRNA FXN. Realizamos un *western blot* para frataxina y en la **figura 6**, observamos una disminución drástica de frataxina tras la transducción con las dos secuencias que probamos (shRNA FXN 535 y shRNA FXN 380) al relativizarlo con el shRNA control. La cuantificación de las intensidades de las bandas obtenidas muestra una reducción similar para ambos shRNA por lo que realizamos los siguientes experimentos sólo con una de las secuencias: la shRNA FXN 380.



Como siguiente paso, infectamos las neuronas con el shRNA FXN o con el shRNA control y determinamos los niveles de frataxina a través de *western blot*. En la **figura 7** podemos observar que tras la infección con los sobrenadantes virales, los niveles de frataxina caen en más de un 45%. Es importante señalar que la viabilidad de las neuronas infectadas con shRNA FXN no se vio afectada por la disminución de frataxina.



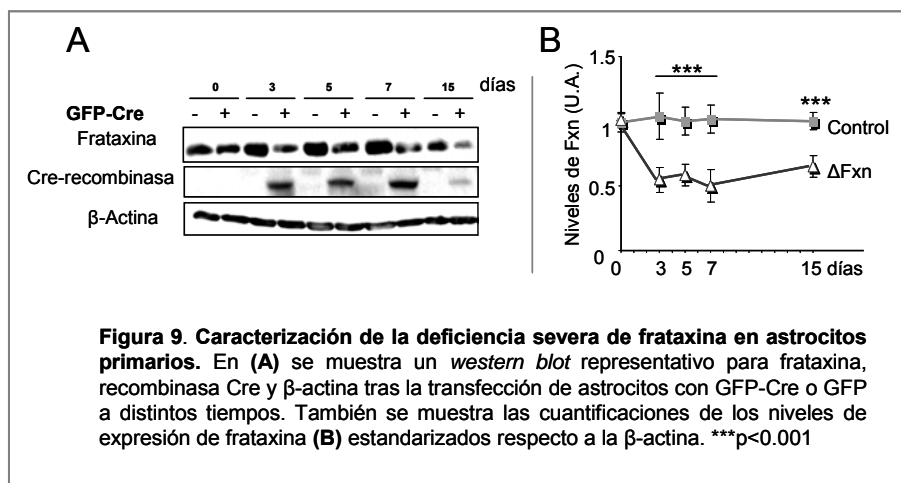
La Ataxia de Friedreich se caracteriza por tener un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS; *reactive oxygen species*) que pueden participar en la patofisiología de la enfermedad. Además, se ha visto que los fibroblastos procedentes de pacientes con FRDA son más susceptibles a los oxidantes y que la deficiencia de frataxina esta relacionada con un aumento en los niveles de estrés oxidativo (Llorens et al, 2007). La **figura 8a** muestra que los astrocitos interferidos con el shRNA FXN 380 presentan un 35% de aumento en los niveles de superóxido mitocondrial (usando el indicador MitoSox Red). A su vez, las neuronas interferidas con el shRNA FXN muestran un aumento cercano al 25% (**figura 8b**).



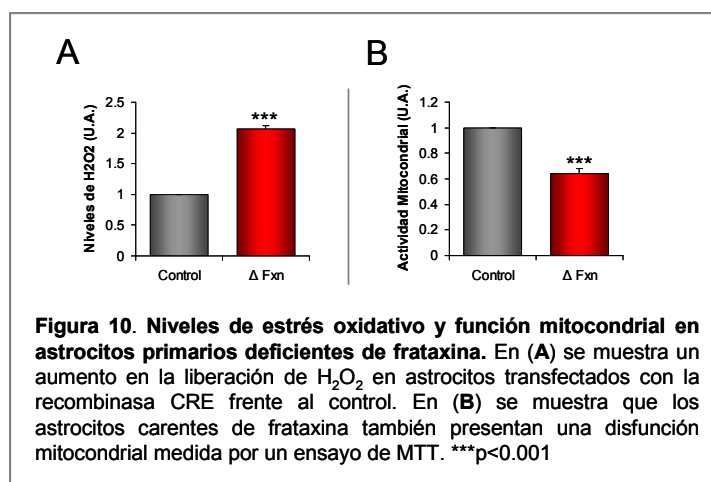
1.2 Deleción de frataxina utilizando células de ratones transgénicos *floxeados* para frataxina

A pesar de que la falta total de frataxina es letal en ratones (Cossée et al, 2000), realizamos un modelo *in vitro* de falta de frataxina severa. Este modelo lo generamos utilizando cultivos de ratones transgénicos *floxeados* de frataxina a los cuales les agregamos los plásmidos CRE o GFP. Esto conlleva la eliminación del exón 4 y por ende a la inactivación del gen. De esta manera, las células transfectadas son deficientes de frataxina de manera permanente y, por esto, el nivel de frataxina residual presente en los cultivos corresponde a la frataxina proveniente de las células que no han sido transfectadas.

Los astrocitos procedentes de ratones transgénicos condicionales de frataxina fueron transfectados con los plásmidos recombinasa CRE o GFP y lisados a diferentes tiempos. A diferencia de lo que ocurre *in vivo*, donde la falta de frataxina en astrocitos es letal; los astrocitos carentes de frataxina pudieron sobrevivir *in vitro* por más de dos semanas a la falta de la proteína (en la **figura 9a**, se observa que los niveles de β -actina no varían a lo largo del tiempo). En la **figura 9b**, se aprecia una reducción en un 50% del nivel de frataxina en los astrocitos transfectados con la recombinasa CRE (al compararlo con el control: astrocitos transfectados con GFP) pasados 3 días de la transfección; esta reducción se mantuvo hasta el día 15.



Teniendo en cuenta que la falta de frataxina es un efecto crónico en la enfermedad; los siguientes experimentos los realizamos en células que no tienen frataxina durante al menos 7 días. En este modelo también evaluamos la producción de ROS en el cultivo. Las células carentes de frataxina presentan un incremento en los niveles de estrés oxidativo medido por la liberación de peróxido de hidrógeno (**figura 10a**) y una disfunción mitocondrial al ser comparadas con las células control (**figura 10b**).



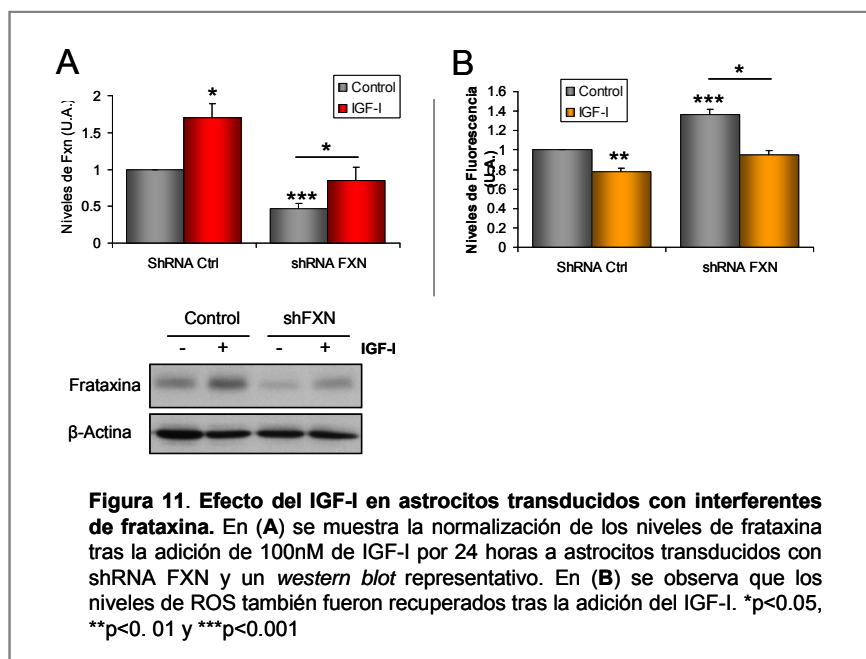
Realizamos el mismo protocolo para las neuronas. En estos cultivos aproximadamente el 40% de las neuronas fueron transfectadas exitosamente. Sin embargo, las neuronas no pudieron resistir la falta de frataxina y murieron en las primeras 48 horas. Es importante notar que la muerte ocurre por un efecto tóxico de las células transfectadas que afecta al resto de la población no transfectada.

2. Efecto de la estimulación con IGF-I

El IGF-I es un factor pleiotrópico con efecto neuroprotector. Esta hormona presenta una amplia gama de funciones sobre las diferentes células del cerebro (Fernández y Torres-Alemán, 2012). Nuestro grupo ya ha observado que el tratamiento con IGF-I es beneficioso en varias ataxias cerebelosas; no sólo en modelos animales sino también en pacientes humanos (Fernández et al, 1998; Arpa et al, 2011). Debido a esto evaluamos el papel del IGF-I en la FRDA utilizando los modelos *in vitro* anteriormente descritos.

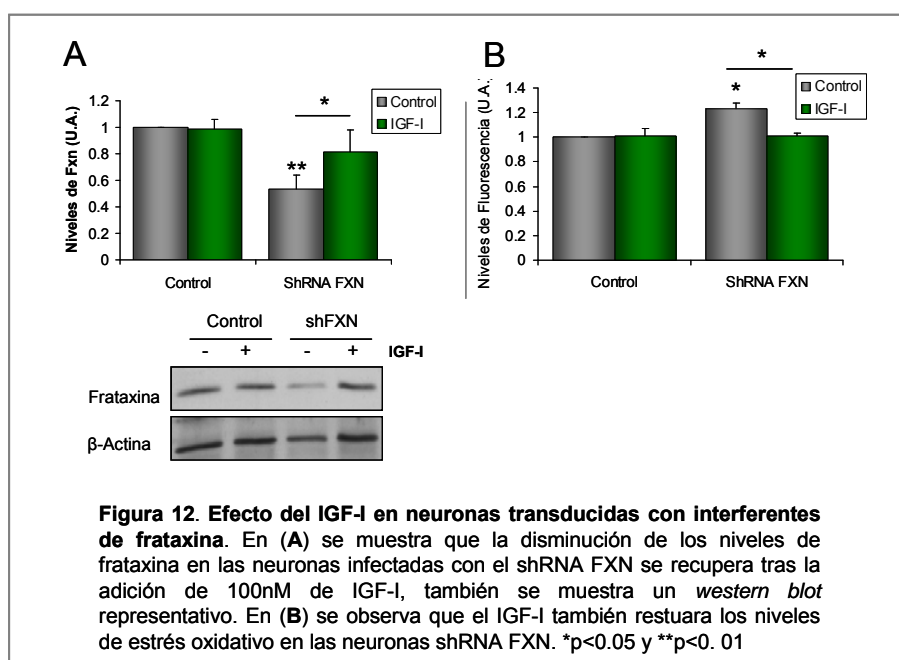
2.1 IGF-I restaura frataxina y normaliza los niveles ROS en astrocitos transducidos con shRNA de frataxina

La estimulación con una dosis de 100 nM de IGF-I durante 24 horas aumenta los niveles de frataxina en los astrocitos interferidos con el shRNA FXN como se muestra en la **figura 11a**. Es importante señalar que el IGF-I también incrementa los niveles proteicos de frataxina en los astrocitos infectados con el shRNA control es decir que aumenta la frataxina en la situación basal. Además, el IGF-I revierte el aumento en los niveles de estrés oxidativo que habíamos observado en los astrocitos infectados con el shRNA FXN e incluso reduce los niveles de estrés oxidativo en la situación basal (**figura 11b**).



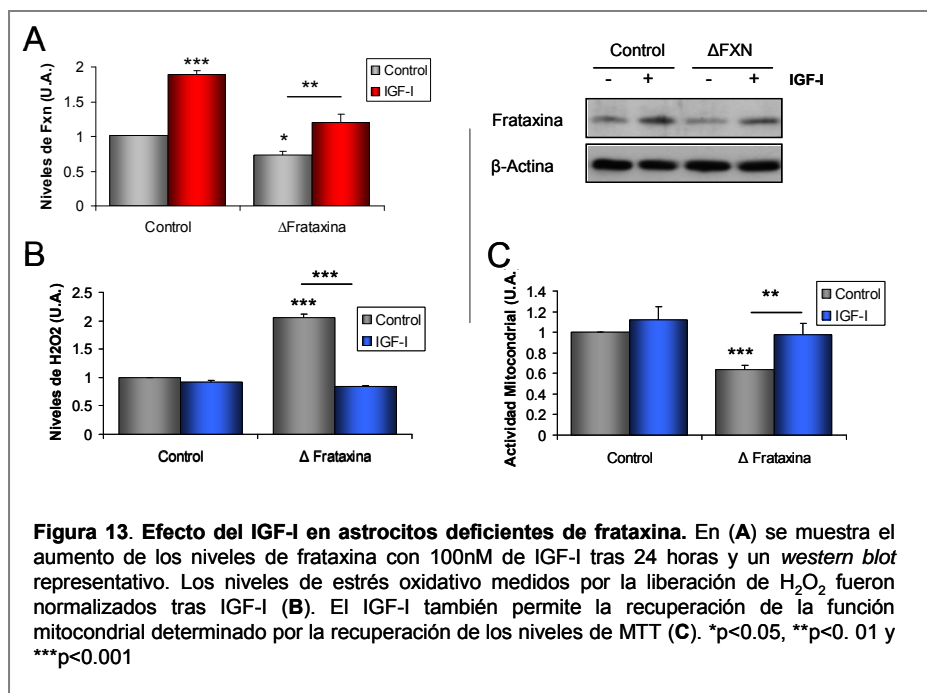
2.2 IGF-I normaliza la frataxina y ROS en neuronas con interferentes de frataxina

Así mismo, el tratamiento con IGF-I normaliza los niveles de frataxina en las neuronas shRNA FXN pero sin afectar las neuronas infectadas con el shRNA control (**figura 12a**). Este resultado muestra que las neuronas, a diferencia de los astrocitos, presentan una respuesta diferencial al IGF-I, dependiendo de los niveles de frataxina que las neuronas posean. Por último, el IGF-I también restaura los niveles de estrés oxidativo en las neuronas con bajos niveles de frataxina (**figura 12b**).

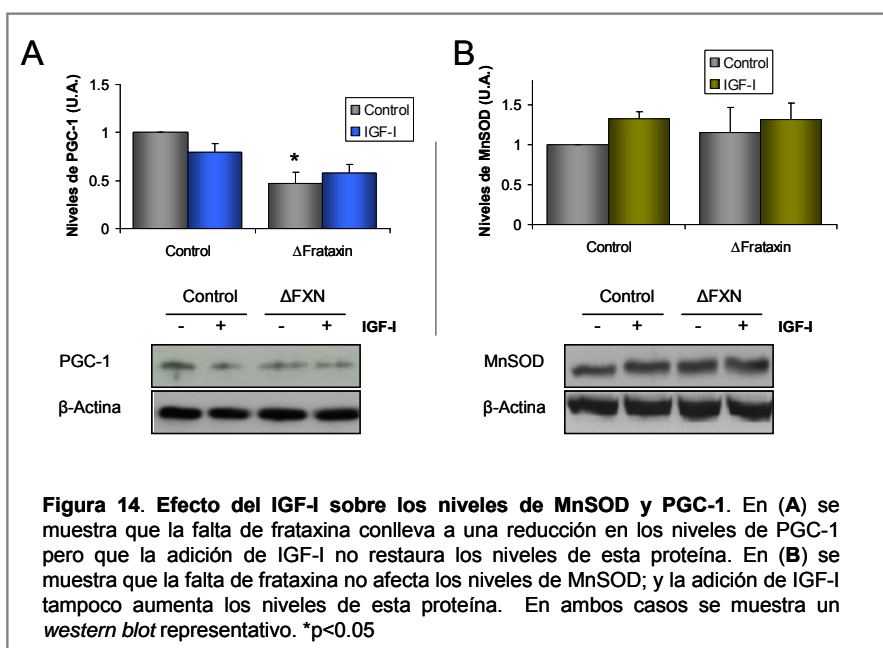


2.3 IGF-I aumenta frataxina a través de un efecto sobre las células control

En el modelo de deficiencia de frataxina más severo, el IGF-I también incrementa significativamente los niveles de frataxina en astrocitos como se observa en la **figura 8a**. Este aumento corresponde a la respuesta de las células no transfectadas con la recombinasa CRE ya que la transfección genera una pérdida permanente del gen de frataxina. En este modelo también pudimos apreciar que las células control (las transfectadas con el GFP) responden duplicando los niveles proteicos de frataxina. Evaluamos si el IGF-I tiene efecto sobre la producción de ROS y la función mitocondrial. El IGF-I normaliza los niveles de H_2O_2 (**figura 13b**) y también recupera la función mitocondrial (**figura 13c**).

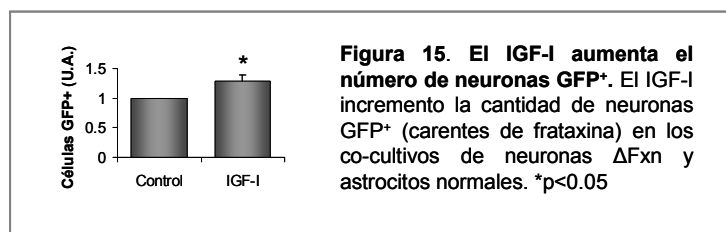


En este modelo severo, estudiamos si el efecto del IGF-I era específico sobre la frataxina o si el IGF-I también tiene efecto sobre otras proteínas. Las proteínas que evaluamos fueron la MnSOD y la PGC-1. La primera se encuentra involucrada en el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno mientras que la segunda regula la biogénesis y el metabolismo mitocondrial. En la **figura 14** se observa que los niveles de PGC-1 caen en las células que carecen de frataxina mientras que los niveles de MnSOD no varían. Sin embargo, en ninguno de los dos casos el IGF-I aumentó los niveles de estas proteínas, sugiriendo que el efecto que ejerce el IGF-I sobre la frataxina es bastante específico.



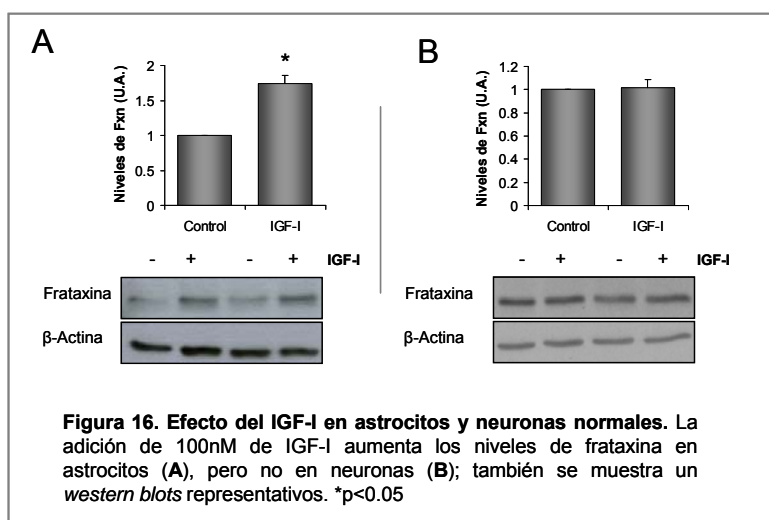
2.4 IGF-I protege a las neuronas ΔFxn a través de un efecto neuroprotector de los astrocitos

Visto que las neuronas que no tienen frataxina están condenadas a una muerte temprana, evaluamos si los astrocitos pueden revertir esta situación a través de un efecto neuroprotector. Realizamos co-cultivos de neuronas que no tienen frataxina (que son GFP⁺, ya que son verdes por haber incorporado el plásmido GFP-cre) con astrocitos normales. En estos evaluamos la viabilidad de las neuronas carentes de frataxina. La sola presencia de los astrocitos en el cultivo permite la supervivencia de las neuronas carentes de frataxina; las neuronas de los co-cultivos sobrevivieron más de 48 horas. Además, vimos que el número de neuronas GFP⁺, es decir aquellas que carecen de frataxina, es mayor en los co-cultivos tratados con IGF-I (**figura 15**). A pesar que el aumento es modesto, este resultado sugiere que el IGF-I protege a las neuronas sin frataxina a través de un efecto neuroprotector de los astrocitos.

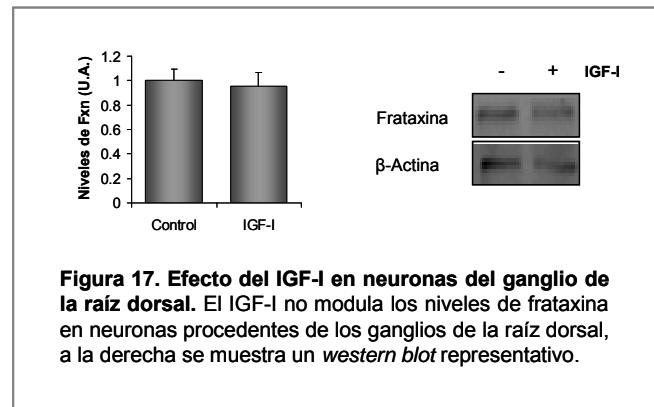


2.5 IGF-I aumenta frataxina en astrocitos pero no en neuronas precedentes de ratones C57BL6

Tal y como habíamos visto anteriormente, el IGF-I actúa sobre los astrocitos normales incrementando los niveles de frataxina (**figura 16a**). Sin embargo, el tratamiento con 100nM de IGF-I durante 24 horas a neuronas granulares del cerebelo no pudo incrementar los niveles proteicos de frataxina (**figura 16b**).



Finalmente, evaluamos el efecto de IGF-I en neuronas provenientes de los ganglios de la raíz dorsal. Las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal son las células más afectadas en la FRDA (Pandolfo, 1999). En la **figura 17** se muestra que el IGF-I no aumenta los niveles de frataxina de la misma manera en que no estimuló la frataxina en las neuronas del cerebelo.



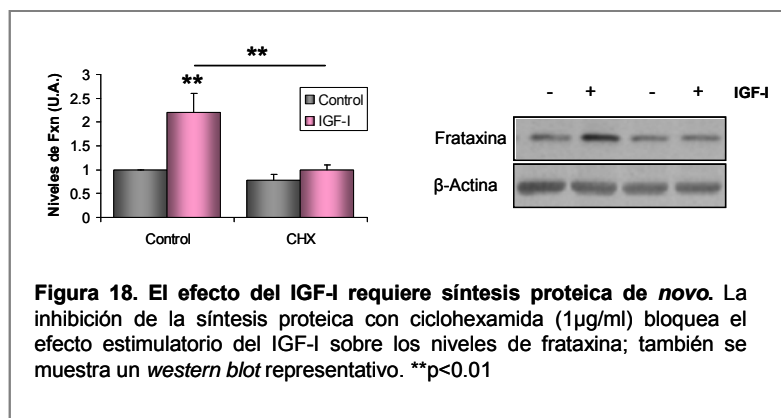
Estos datos muestran una diferencia clara en la respuesta al IGF-I de neuronas y astrocitos normales, sugiriendo una posible regulación diferencial de la frataxina de acuerdo al tipo celular.

3. Ruta de acción del IGF-I

Una vez visto que el IGF-I aumenta los niveles de frataxina evaluamos a que nivel actúa este factor. Para hacer más sencillos los experimentos, utilizamos astrocitos procedentes de ratones C57BL6 ya que estos responden al IGF-I de la misma manera que los astrocitos y las neuronas deficientes de frataxina.

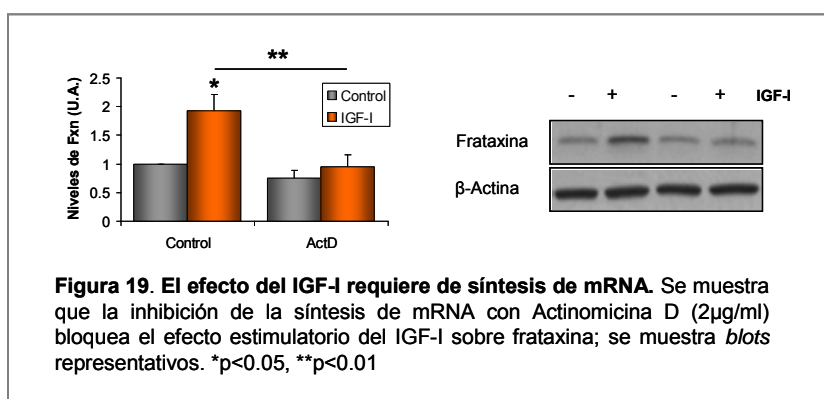
3.1 La acción de IGF-I requiere de síntesis *de novo* de proteína

Como primer paso evaluamos si el IGF-I actúa directamente sobre la síntesis de proteína. Para esto utilizamos la ciclohexamida que inhibe la biosíntesis proteica en eucariotas; esta droga interfiere el paso de translocación con lo cual bloquea la enlogación traduccional. La adición de 1µg/ml de ciclohexamida 3 horas antes de la estimulación con IGF-I bloquea la acción de este factor sobre la frataxina como se observa en la **figura 18**. Esto muestra que la acción del IGF-I requiere de la síntesis proteica de la frataxina.

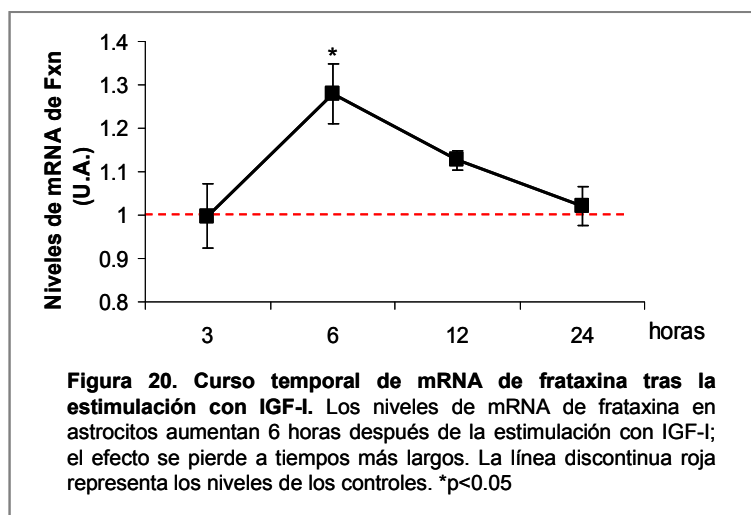


3.2 El IGF-I actúa sobre el mRNA de frataxina

El segundo paso fue observar si el efecto del IGF-I era dependiente de la transcripción, es decir si el IGF-I aumenta la frataxina a través de un incremento en los niveles de mRNA. Para estudiar esto, utilizamos actinomicina D, un inhibidor de la transcripción, el cual se une al ADN en el complejo de iniciación de la transcripción y así evita la elongación llevada a cabo por la RNA polimerasa. En la **figura 19** se observa que la actinomicina D también bloquea el efecto del IGF-I sobre la frataxina como lo vimos con la adición de la ciclohexamida. Este resultado señala que el efecto del IGF-I requiere de síntesis de mRNA.



La siguiente pregunta es por tanto, si el IGF-I aumenta directamente los niveles de mRNA de frataxina. Estimulamos los astrocitos con IGF-I durante 3, 6, 12 y 24 horas y realizamos una qPCR para frataxina a estos tiempos. El curso temporal muestra que a 6 horas hay un aumento modesto pero significativo del mRNA de frataxina como se muestra en la **figura 20**.



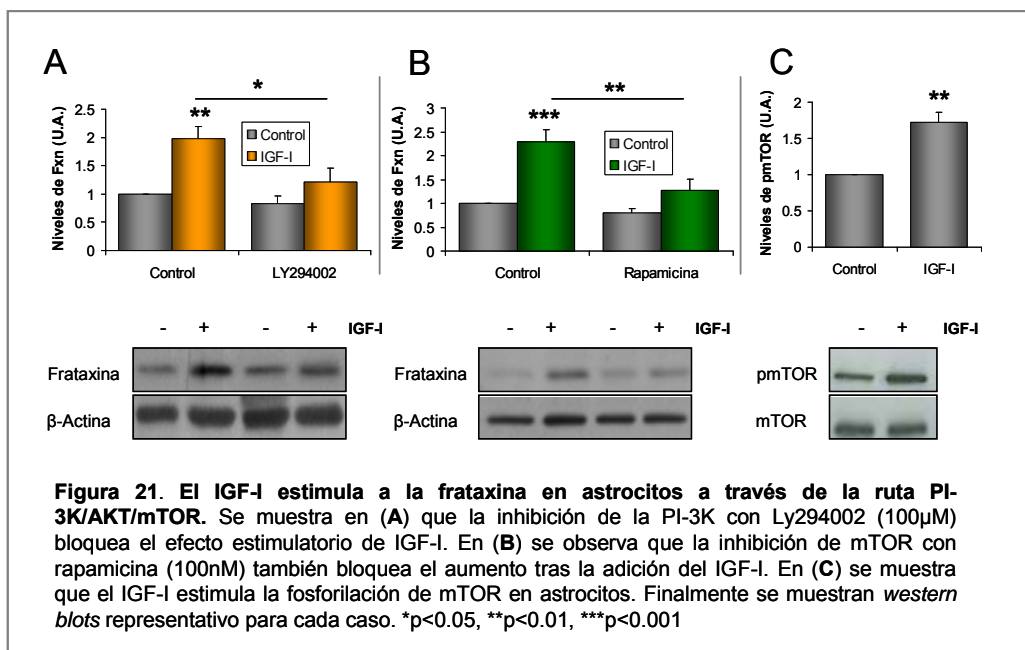
Estos datos muestran que el IGF-I actúa en ambos niveles; estimulando la traducción y la transcripción de la frataxina. El aumento proteico de frataxina, mediado por IGF-I, requiere la síntesis *de novo* de proteína y de mRNA.

3.3 La ruta utilizada por IGF-I es PI-3K/AKT/mTOR

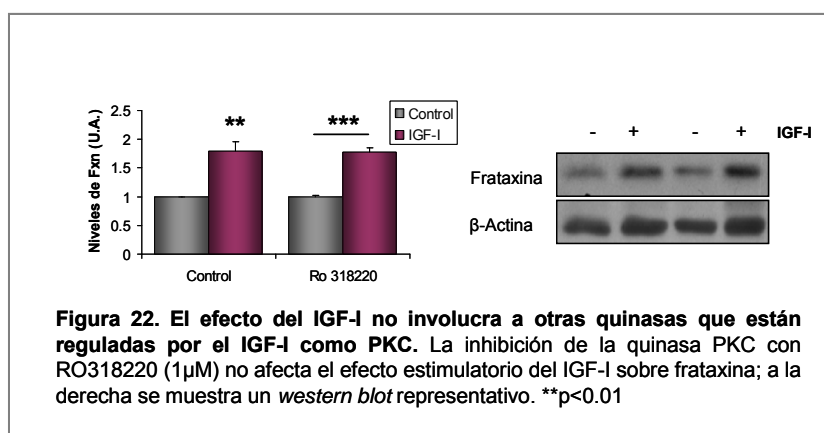
El IGF-I activa fundamentalmente, dos rutas canónicas, la vía MAPK y la vía PI-3K. La primera opción que consideramos fue la ruta PI-3K/AKT/mTOR ya que esta promueve la síntesis de proteína.

3.3.1 El IGF-I utiliza la ruta PI-3K/AKT/mTOR para modular la frataxina en astrocitos

Procedimos a bloquear PI-3K y mTOR usando LY294002 (100 μ M) y rapamicina (100nM) respectivamente. Los resultados muestran que el efecto del IGF-I sobre la frataxina fue abolido cuando se bloqueo PI-3K (**figura 21a**) y mTOR (**figura 21b**). Por otra parte, evaluamos los niveles de fosforilación de mTOR, una medida indirecta del estado de activación de esta quinasa. El ratio pmTOR/mTOR aumentó tras el tratamiento con IGF-I como se aprecia en la **figura 21c**.

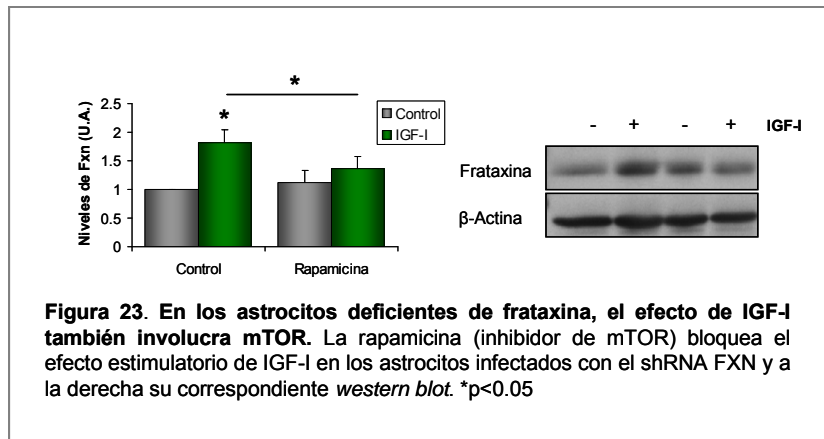


Para confirmar estos datos evaluamos otra de las quinasas que se encuentran debajo del receptor del IGF-I, la PKC. En la **figura 22** se puede ver que RO 318220, un inhibidor específico de la quinasas PKC, no bloquea el aumento de frataxina.

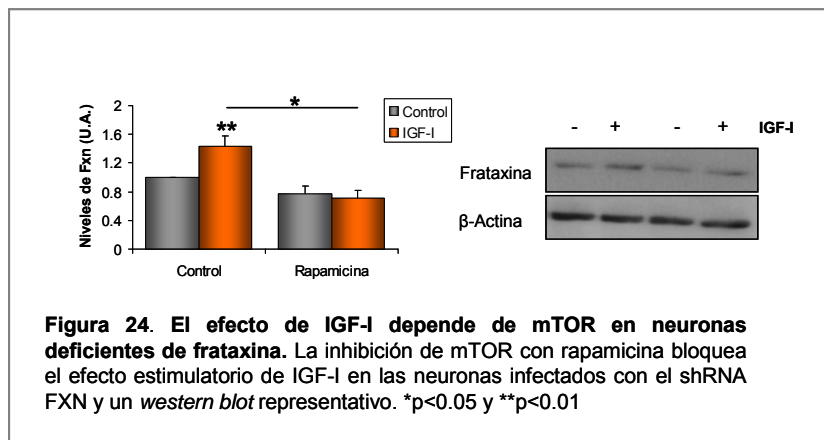


3.3.2 La via AKT/mTOR también está activa en astrocitos y neuronas deficientes de frataxina

Confirmamos que la ruta PI-3K/AKT/mTOR se encuentra activa tras la adición del IGF-I en los astrocitos infectados con el shRNA FXN. Los resultados de la **figura 23** muestran que en las células infectadas con el shRNA FXN, la rapamicina bloquea el efecto del IGF-I. Esto muestra que la ruta por la que actúa el IGF-I es la misma en ambos casos, tanto en la situación basal como en astrocitos con bajos niveles de frataxina.

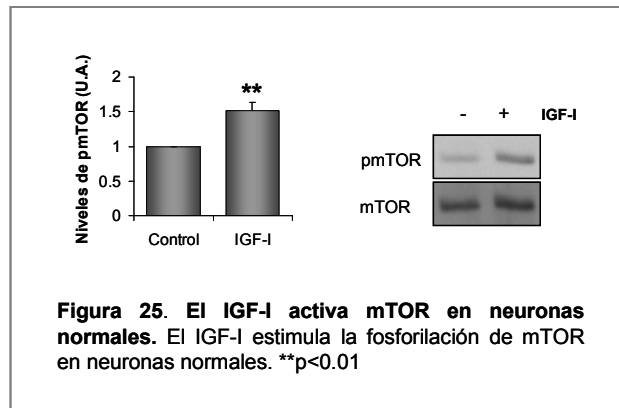


Nuestro siguiente objetivo fue evaluar si la ruta implicada en las neuronas interferidas con el shRNA FXN es la misma que en astrocitos. Para responder esto, inhibimos mTOR con 100nM de rapamicina en las neuronas interferidas con shRNA FXN. En la **figura 24** se muestra que cuando la rapamicina está presente en el medio, el efecto del IGF-I se bloquea como ocurre en los astrocitos (**figura 23**). Este resultado muestra que el IGF-I incrementa los niveles de frataxina en neuronas y astrocitos a través de la misma ruta.



3.3.3 IGF-I activa mTOR en neuronas normales

Como siguiente paso buscamos explicar porqué las neuronas C57BL6 y las neuronas deficientes de frataxina responden diferente ante IGF-I. La primera opción fue que la ruta PI3K/AKT/mTOR no se active por IGF-I en neuronas normales. La **figura 25** muestra que el ratio de pmTOR/ mTOR aumenta en neuronas granulares del cerebelo tras la adición de IGF-I lo cual indica que la ruta está activada.

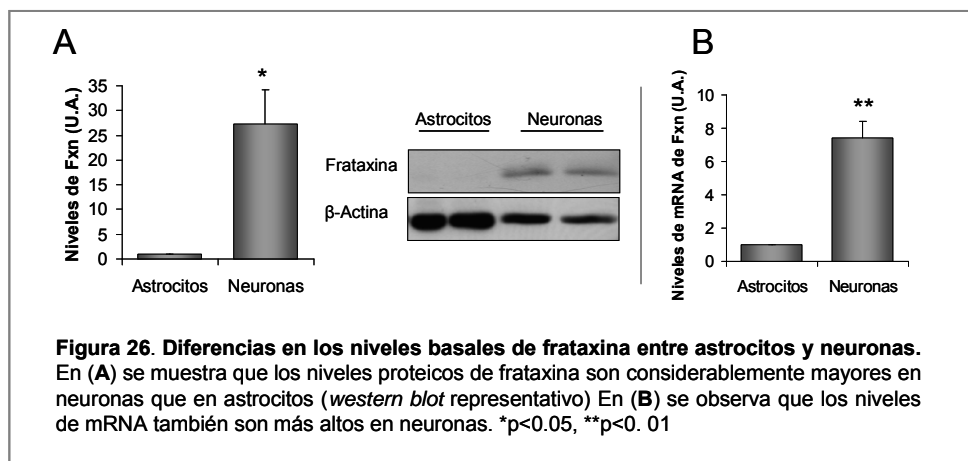


4. Mecanismos subyacentes a la falta de efecto del IGF-I en neuronas

Exploramos diferencias potenciales entre astrocitos y neuronas procedentes de ratones C57BL6 para intentar explicar por qué los astrocitos y neuronas con niveles normales de frataxina responden diferente al IGF-I y por qué las neuronas responden o no al IGF-I de acuerdo a los niveles de frataxina que éstas tengan.

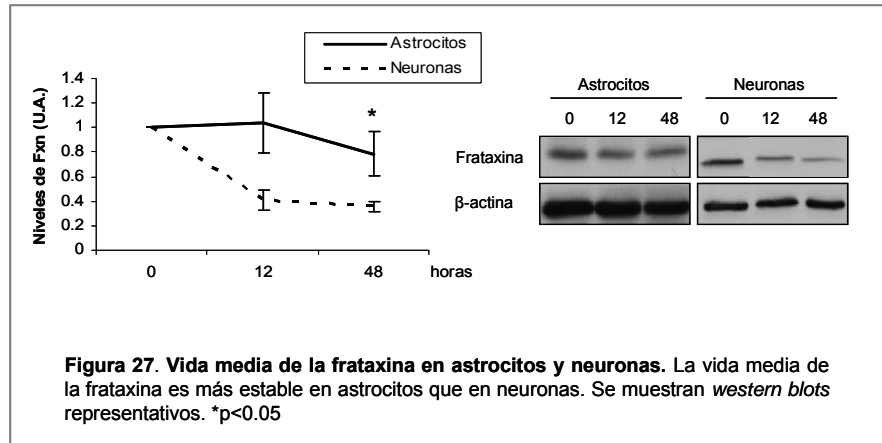
4.1 Diferencias entre los niveles basales de frataxina entre astrocitos y neuronas

La primera opción que evaluamos fue los niveles basales de frataxina en ambos tipos celulares. En la **figura 26a** se muestra que los niveles proteicos de frataxina son 25 veces más altos en las neuronas que en los astrocitos. Además, se muestra en la **figura 26b** una marcada diferencia en los niveles de mRNA de frataxina; en neuronas hay 7 veces más mRNA de frataxina que en astrocitos. Esto sugiere que las neuronas requieren de niveles más alto de esta proteína para su funcionamiento normal.



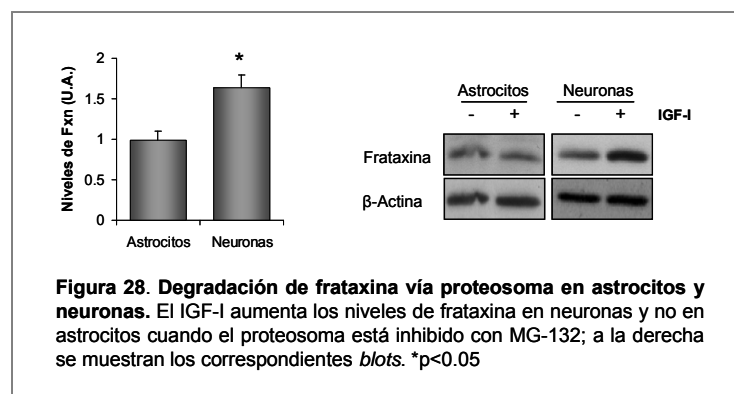
4.2 La frataxina tiene una vida media más corta en neuronas

Como siguiente paso evaluamos si existen diferencias en la estabilidad de frataxina entre los astrocitos y las neuronas. Evaluamos la vida media de frataxina en ambos tipos celulares. En la **figura 27** se puede ver que la frataxina, después de agregar ciclohexamida por 0, 12 y 48 horas, se mantiene bastante estable en astrocitos con una vida media superior a 48 horas, mientras que en neuronas tiene una vida media mucho más corta (menor a 12 horas).



4.3 La degradación de frataxina es más rápida en neuronas que en astrocitos

Finalmente evaluamos la vía del proteosoma utilizando el inhibidor MG-132 que reduce la degradación de las proteínas ubiquitinadas al bloquear la actividad proteolítica del complejo 26S. Los astrocitos y neuronas tratadas con 10 μ M de MG-132 durante 10 horas, presentan un aumento (aunque es no significativo) en los niveles de frataxina con respecto a sus controles sin tratar. Esto concuerda con lo descrito por Rufini et al, 2011 que señala que la degradación de la frataxina es regulada por el proteosoma. En la **figura 28**, vemos que la adición de IGF-I aumenta los niveles de frataxina en neuronas que tienen el proteosoma inhibido pero no en astrocitos.



Estos datos muestran una clara diferencia en la regulación de frataxina entre astrocitos y neuronas.

5. El IGF-I como potencial agente terapéutico en FRDA

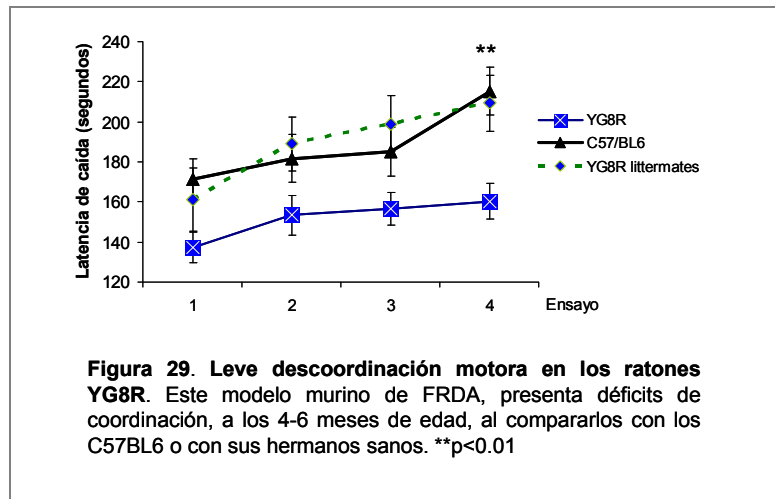
Desafortunadamente en la actualidad no existe un tratamiento eficaz para FRDA. Una de las principales aproximaciones para buscar una cura se basa en aumentar los niveles de frataxina dentro de la célula. Como hemos mostrado en los apartados anteriores, el IGF-I aumenta los niveles de frataxina *in vitro*, por esto evaluamos su potencial uso como terapia en esta enfermedad.

5.1 IGF-I restaura los problemas de coordinación motora en un modelo murino de FRDA

Como siguiente paso, evaluamos si los efectos *in vitro* del IGF-I podrían traducirse en una posible acción terapéutica en FRDA, para lo que buscamos un modelo que replique la enfermedad y en éste probar un tratamiento.

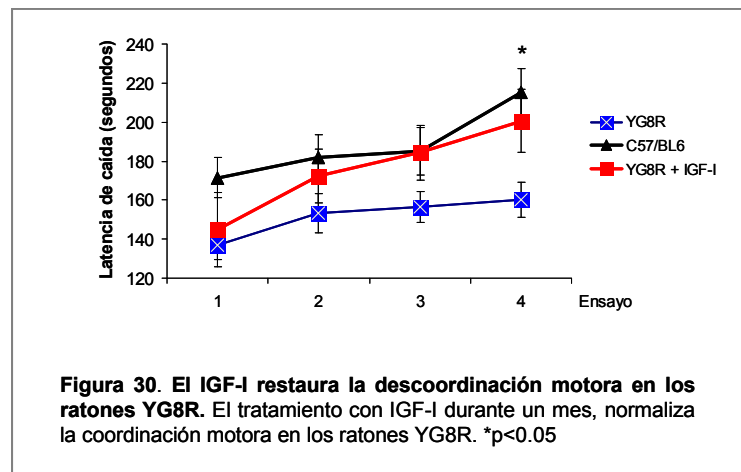
Actualmente, existen varios modelos para FRDA aunque todos estos presentan importantes limitaciones a tener en cuenta. Los modelos se pueden dividir en dos grandes grupos: los primeros presentan una ataxia severa seguida de una muerte prematura y los otros una descoordinación motora muy modesta pero sin cambios en la supervivencia. Para esta tesis, hemos elegido el modelo YG8R que pertenece al segundo grupo, es decir aquellos que tienen una descoordinación motora muy moderada porque consideramos que el ratón YG8R es el más adecuado dado que es el que más se asemeja a la patología humana ((Al-Mahdawi et al. 580-90); tiene daños en los ganglios de la raíz dorsal y el músculo esquelético entre otros. Este ratón porta un transgén con la frataxina humana mutada que contiene dos secuencias de repeticiones, una de 82 y la otra de 190, para el triplete GAA sobre un fondo genético nulo para la frataxina murina.

En el artículo original del grupo de Pook, se observa que los ratones YG8R presentan déficits de coordinación a partir de los 3 meses en un test de rotarod con aceleración constante. Nosotros repetimos el mismo protocolo en ratones de 4-6 meses y obtuvimos los mismos resultados, aunque la ataxia es más modesta. En la **figura 29**, se observa que los ratones YG8R presentan una leve descoordinación motora al ser comparados con sus hermanos o con controles C57BL6.



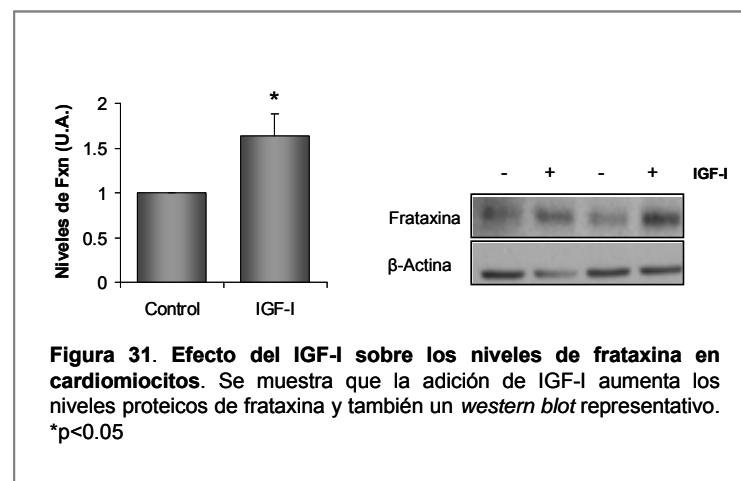
Se ha descrito que los niveles de insulina e IGF-I en suero así como las proteínas de unión al IGF-I (IGFBPs) están alterados en muchas enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica o diferentes tipos de ataxia cerebelosas (Carro et al, 2004; Torres-Alemán et al, 1998; Fernández et al, 1998). Por otra parte, se conoce que pacientes con ataxia telangectasia presentan resistencia al receptor de IGF-I (Shahrabani-Gargir, Pandita, and Werner 5679-87; Busiguina et al. 657-65; Coppola et al. 2452-61) que es una condición muchas veces asociada con una disregulación en el sistema IGF-I (Fernández y Torres-Alemán, 2012). Tomando en cuenta todo esto, evaluamos los niveles de mRNA del receptor de IGF-I y del péptido en cerebelo, así como, los niveles séricos de IGF-I en ratones YG8R y C57BL6. En ninguno de los casos se vieron cambios.

A pesar de no encontrar ningún tipo de disregulación en el sistema IGF-I, evaluamos si el tratamiento con IGF-I subcutáneo (50µg/Kg/día) durante 1 mes puede mejorar los déficits en coordinación motora. En la **figura 30**, se muestra que el IGF-I mejora el rendimiento de los ratones YG8R en el test de rotarod. Sin embargo, el IGF-I no aumentó los niveles de la frataxina humana mutada (dado que estos ratones no tienen la frataxina murina endógena).

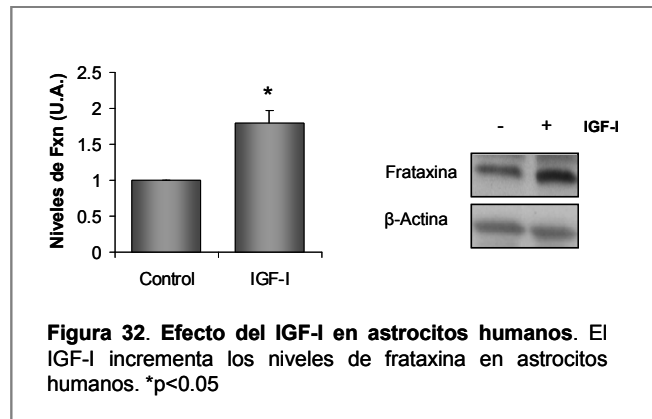


5.2 El IGF-I también actúa en células no neurales así como en células humanas

La frataxina es una proteína ubicua, aunque es más abundante en tejido de alto requerimiento energético como el corazón y la médula espinal. Además, el corazón es uno de los tejidos más afectados de esta enfermedad. Es por esto, que evaluamos si el IGF-I tiene el mismo efecto estimulador en cardiomiocitos. En la **figura 31**, se puede ver que la adición de IGF-I también aumenta los niveles de frataxina en estas células no neurales.



Finalmente, evaluamos si el IGF-I tiene un efecto estimulador en células humanas. Visto que los astrocitos murinos responden al IGF-I independientemente de los niveles basales de frataxina, evaluamos si los humanos responden igual. En la **figura 32** se muestra que el tratamiento con IGF-I aumenta la frataxina de manera similar a como ocurrió en astrocitos de ratón.



6. Impacto de la falta de frataxina en astrocitos *in vivo*

En los resultados anteriores hemos visto que la deficiencia severa de frataxina es perjudicial en un cultivo neuronal y conlleva a una muerte prematura del mismo, mientras que un cultivo de astrocitos es más resistente y logra sobrevivir por más de 15 días. Por otra parte, se ha visto que los astrocitos están involucrados activamente en el procesamiento de información en el cerebro y que disfunciones en la astrogliosis o incluso en funciones específicas de este tipo celular están involucradas en muchas enfermedades neurológicas (Seifert et al, 2006). Esto nos llevó a estudiar el papel de la falta de frataxina en astrocitos *in vivo* y para así entender el papel que pueda jugar el astrocito en esta patología

6.1 Generación y fenotipado del ratón FAsKO (*frataxin astrocyte knockout mice*)

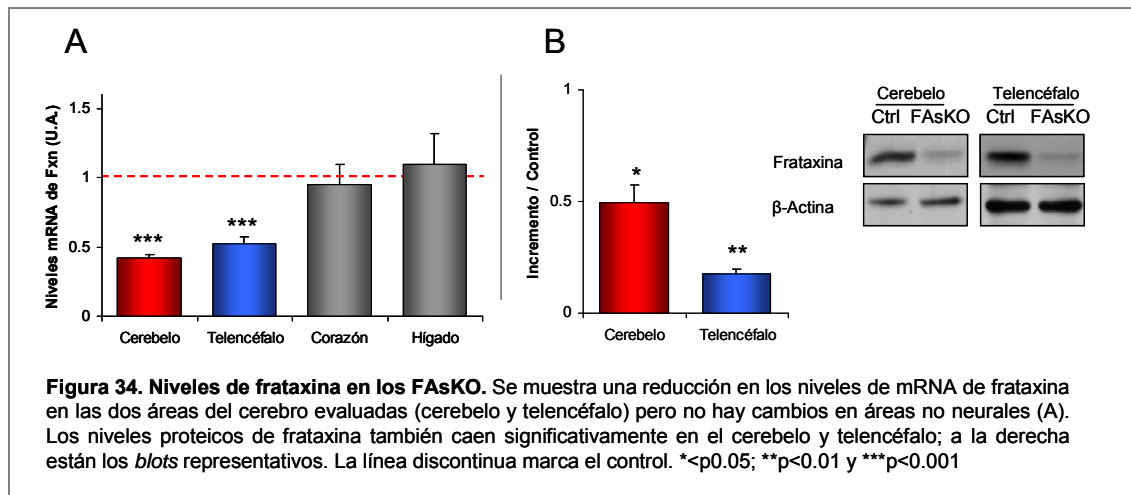
Para esto generamos un ratón que carece de frataxina únicamente en astrocitos. Este ratón lo obtuvimos mediante el cruce de ratones transgénicos “floxeados” para la frataxina con otra cepa de transgénicos que expresa la recombinasa CRE bajo el promotor GFAP humano. El ratón resultante lo denominamos FAsKO.

El fenotipo de estos ratones fue bastante claro. Los ratones FAsKO tienen una ataxia severa (**video 1**), una drástica caída del peso corporal y una muerte prematura en comparación con sus hermanos. Los FAsKO tienen una esperanza de vida muy corta (25 ± 1.5 días); por lo que todas las mediciones las realizamos a los 21 días. Estos ratones presentan una reducción de 40% en su peso corporal (10.6 ± 0.4 gramos en controles vs 6.2 ± 0.4 en FAsKO) y en el tamaño (**figura 33**).



Figura 33. Ratón FAsKO de 3 semanas de edad. En la imagen se ve la diferencia de tamaño entre un ratón FAsKO (izquierda) y su hermano sano (derecha).

En la **figura 34a** podemos ver que los niveles de mRNA de frataxina están disminuidos respecto a sus hermanos en el cerebro (cerebelo y telencéfalo) pero no en tejidos no neurales (hígado y corazón). Esta reducción en los niveles de mRNA de frataxina en cerebelo y telencéfalo está acompañada de una disminución en los niveles proteicos de frataxina (**figura 34b**).



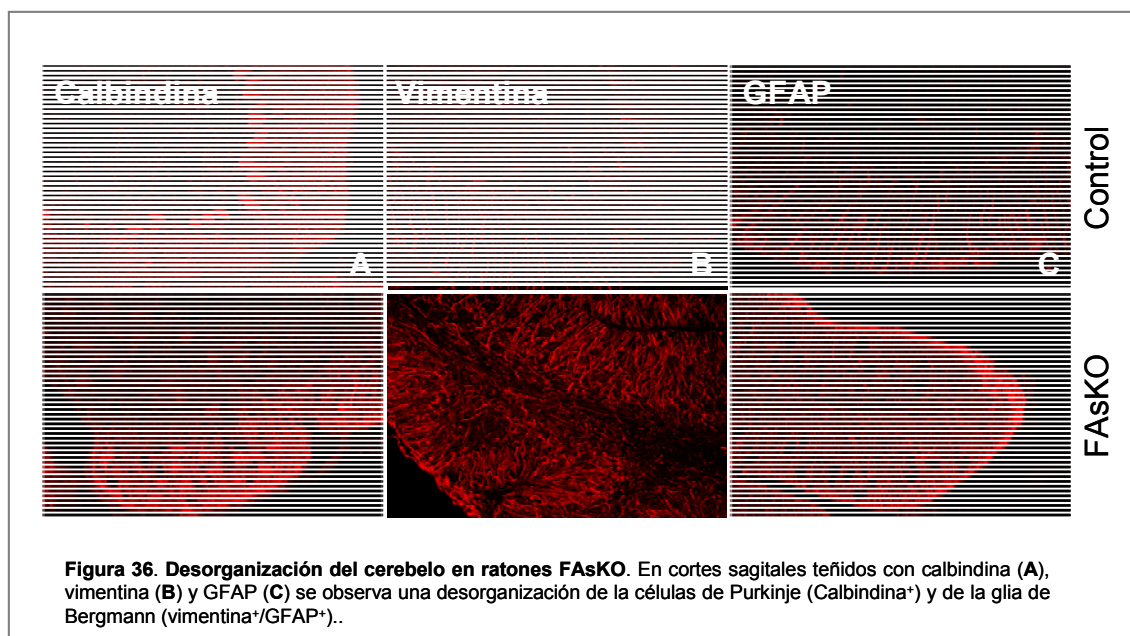
6.2 Vulnerabilidad selectiva del cerebelo tras la ablación de frataxina en astrocitos

El FAsKO presenta alteraciones bastante importantes en el cerebro. Las modificaciones son más evidentes en el cerebelo que en el resto del cerebro. En la **figura 35**, se puede ver que el cerebelo

es considerablemente más pequeño aunque aparentemente conserva la estructura macroscópica (i.e. los 10 lóbulos). El cerebelo además presenta marcadas anomalías histológicas.

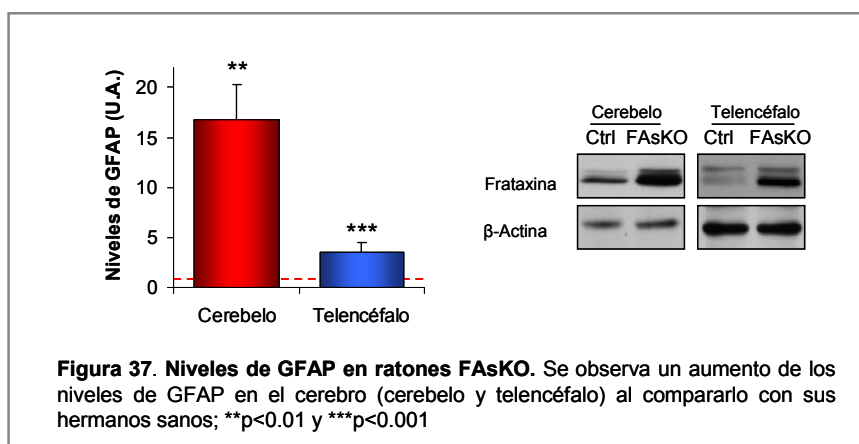


Específicamente, se observa una marcada reducción en la población de las células granulares así como una desorganización de las células de Purkinje (células calbindina⁺, **figura 36a**). Los somas de las neuronas de Purkinje se encuentran aglomeradas en la capa molecular del cerebelo, quizás por la falta de fibras paralelas debido a la reducción de neuronas granulares. Por otra parte, la glia de Bergmann (células GFAP⁺ / vimentina⁺; **figura 36/c**) también está desorganizada sin formar su característica red radial pudiendo ser la causante de la falta de neuronas granulares.

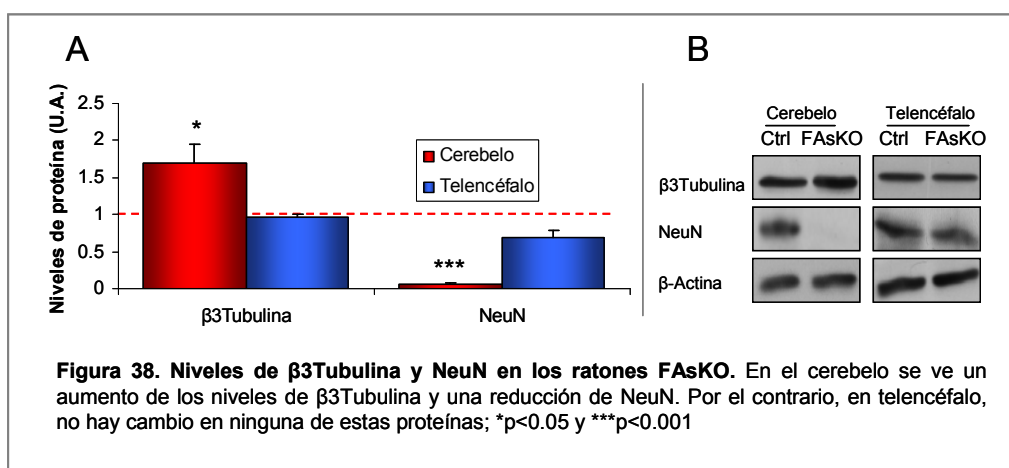


Visto que la GFAP parece estar aumentada en cortes histológicos de los FAsKO, evaluamos los niveles proteicos de esta proteína. En la **figura 37**, se muestra un aumento significativo en los

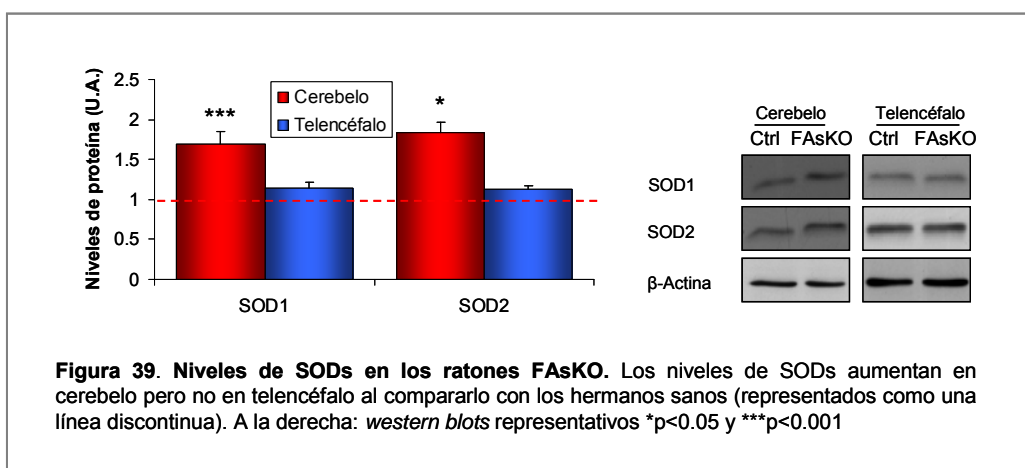
niveles de GFAP en cerebelo y en telencéfalo. Esto indica que hay una marcada astrocitosis reactiva en el cerebro.



Como siguiente paso evaluamos el estado de las neuronas de ambas regiones. En el cerebelo se ve un aumento de los niveles de β 3tubulina (un indicador de neuronas inmaduras) acompañado de una marcada reducción en los niveles de NeuN (marcador de neuronas maduras) mientras que en el telencéfalo se observa una pequeña reducción pero no significativa de los niveles de NeuN sin cambios en los niveles de β 3tubulina (**figura 38**). Esto parece indicar que hay menos neuronas maduras en el cerebro y además hay un defecto en la maduración neuronal en el cerebelo.



La falta de frataxina genera un incremento en los niveles de estrés oxidativo en algunos tipos celulares. Nuestros cultivos celulares deficientes en frataxina también mostraron un aumento en la producción de ROS. Es por eso que evaluamos los niveles de dos de las superóxido dismutasas (SOD1 y SOD2) que son parte del sistema enzimático de defensa celulares contra la producción de ROS. Los niveles proteicos de SOD1 (citoplasmática) y de SOD2 (mitocondrial) están aumentados en el cerebelo del FAsKO pero no en el telencéfalo (**figura 39**).

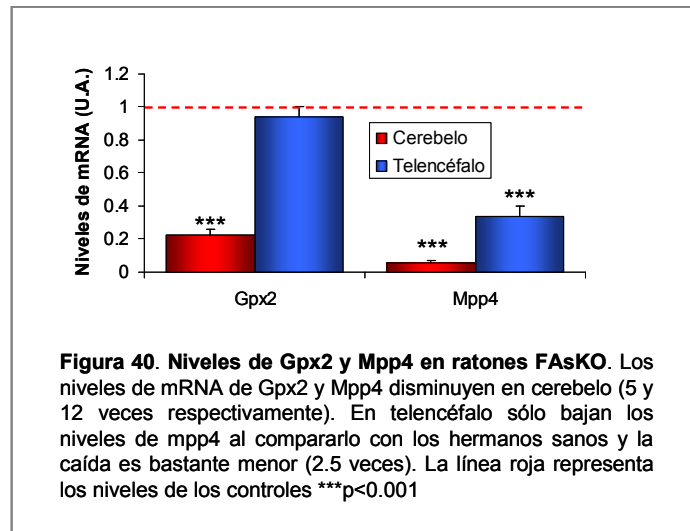


Visto que había cambios en las SODs, específicamente en el cerebelo, medimos expresión genes de estrés oxidativo y defensa anti-oxidante en el cerebelo del FAsKO para buscar posibles genes implicados en estos cambios. De los 84 genes que evaluamos, sólo 5 genes estuvieron modulados. En la **tabla 5** se muestran los genes así como la variación que tienen frente al control. De estos genes, 4 estuvieron regulados a la baja y uno al alza.

Tabla 5: genes modulados en los FAsKO. En rojo se muestran los genes que están disminuidos y en verde el que está aumentado.

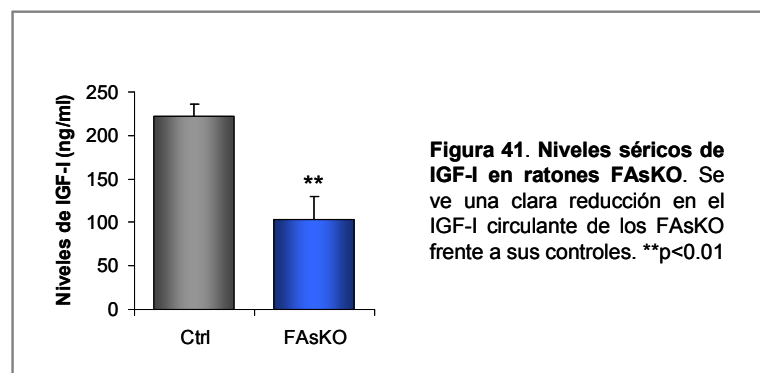
Gen	Cambios/control
Als2	-4.634
Duox1	-13.1426
Gpx2	-4.8476
Mpp4	-12.0283
Mpo	8.2495

Para confirmar los datos obtenidos con el array realizamos qPCRs; escogimos dos genes: gpx2 y Mpp4. En la **figura 40**, podemos ver que, en cerebelo, los niveles de Gpx2 son 5 veces menos y los de MPP4 12 veces menos que sus controles. Las reducciones resultantes son bastante similares a las que obtuvimos con el array. En el caso del telencéfalo, se observa una reducción en los niveles de Mpp4 aunque Gpx2 se mantiene estable. Esto sugiere que la falta de frataxina en astrocitos afecta mucho más al cerebelo que al telencéfalo.

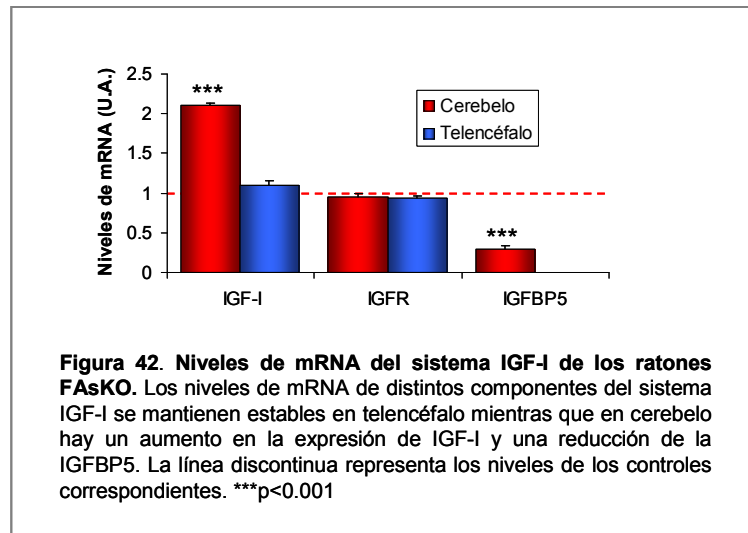


6.3 Desregulación del sistema IGF-I en el FAsKO

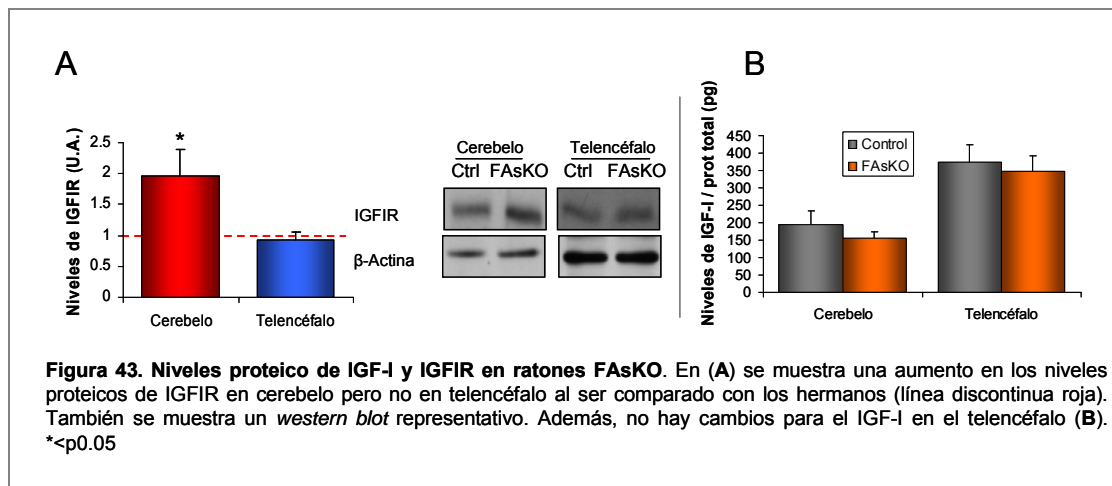
Finalmente evaluamos el sistema IGF-I en los FAsKO. Como hemos señalado previamente, muchas enfermedades neurodegenerativas están acompañadas de cambios importantes en los niveles séricos de este factor. Para comenzar medimos los niveles de IGF-I en suero mediante un ELISA y obtuvimos unas diferencias bastante grandes, los FAsKO tienen la mitad de IGF-I en sangre que sus controles (**figura 41**).



Continuamos estudiando la ruta de IGF-I debido a los cambios en el suero. Evaluamos los niveles de mRNA de IGF-I, de IGFIR y de IGFBP5 (su proteína de unión más abundante en el cerebelo). En la **figura 42**, podemos ver que los niveles de mRNA del IGF-I y del IGFIR no están afectados en el telencéfalo, mientras que en el cerebelo se aprecian cambios importantes. Se muestra un aumento en el mRNA de IGF-I acompañado de una caída en el mRNA de IGFBP5 sin cambios a nivel del receptor.



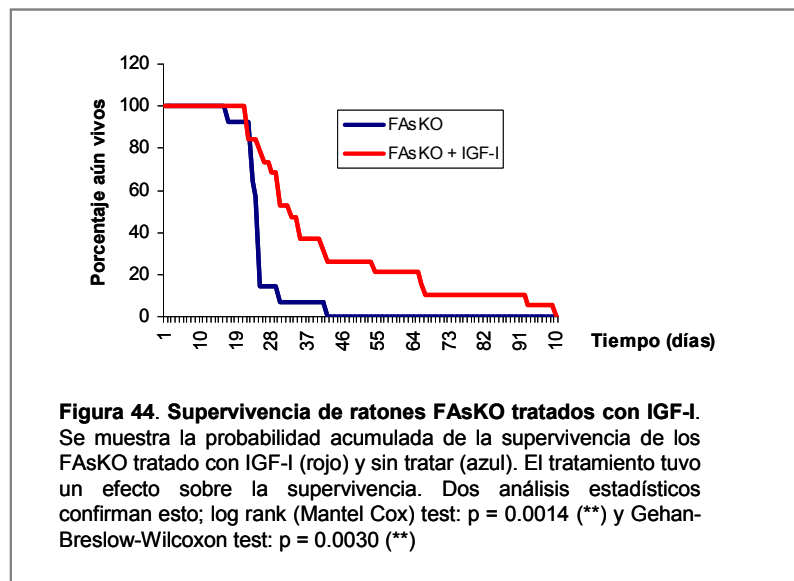
Después estudiamos los niveles proteicos del IGF-I y del IGFR. En el cerebello, se muestra un aumento significativo de los niveles del receptor mientras que los niveles del telencéfalo no se modifican (**figura 43a**). Así mismo, medimos los niveles de IGF-I en cerebello y telencéfalo, en la **figura 43b** se muestra que no hay cambios en IGF-I en ninguna de estas áreas.



6.4 El IGF-I aumenta la supervivencia y mejora la actividad motora en los FAsKO

Finalmente, evaluamos si una terapia con IGF-I tiene algún efecto sobre estos animales. El tratamiento lo comenzamos en P7 por lo que no podemos emplear bombas osmóticas debido a que los ratones se encuentran por debajo del tamaño mínimo requerido (10 gramos); en este caso utilizamos microesferas con IGF-I. En la **figura 44**, se muestra que los ratones tratados viven un 70% más (los FAsKO + IGF-I vivieron 43 ± 5.5 días en comparación con los 25 ± 1.5 días que vivían normalmente). Así mismo, los ratones tratados con IGF-I tienen un aspecto más saludable y

mejor movilidad a los 21 días. En el **video 2** se muestra un ratón FAsKO con sus hermanos y se ve que el ratón es claramente más pequeño y presenta una ataxia severa, prácticamente no tiene movilidad. En el **video 3**, se muestra dos ratones FAsKO tratados con IGF-I junto con sus hermanos; en este caso los animales tratados tienen un aspecto más saludable y no muestran gran diferencia de tamaño. Sin embargo, continúan presentando una ataxia, aunque no tan severa como los FAsKO sin tratar. Además, estos ratones parecen tener más movilidad que los animales no tratados.



DISCUSIÓN

La Ataxia de Friedreich es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza principalmente por la degeneración de neuronas sensoriales y del tracto espinocerebeloso, y por presentar cardiomiopatías (Palau, 2001; Pandolfo, 2009). Esta enfermedad está causada por una reducción en los niveles de frataxina, una proteína mitocondrial. El papel exacto de esta proteína sigue siendo desconocido, pero se ha sugerido que participa en el metabolismo intracelular del hierro, y que su deficiencia estaría relacionada con incrementos en los niveles intracelulares de estrés oxidativo (Richardson et al, 2010; Pandolfo, 2008; Marmolino, 2011). Además, se ha visto que algunos pacientes de FRDA muestran una resistencia a la insulina (Coppola et al, 2009), una condición muchas veces asociada con disfunciones en el sistema IGF-I (Dunger et al, 2004). A pesar de que mucho de los mecanismos moleculares implicados en la FRDA se conocen, aún no existe ninguna terapia eficaz para esta patología. Actualmente, las estrategias para encontrar una terapia apuntan a incrementar la expresión de frataxina, o a intervenir en la cascada patogénica que subyace a la falta de frataxina.

El IGF-I es una hormona que tiene propiedades neuroprotectoras que afectan a muchas células del cerebro (Carro y Torres-Alemán, 2006; Russo et al, 2005; Dudek et al, 1997), y que es muy abundante en el cerebelo durante la etapa adulta. Se ha visto que disfunciones en el sistema IGF-I contribuyen en la muerte neuronal en varios modelos experimentales de ataxia cerebelosa (Fernández et al, 1998; Vig et al, 1994; Zhang et al, 1996). El tratamiento con IGF-I en animales atáxicos puede hacer que estos recuperen la coordinación motora (Carro et al, 2001; Fernández et al, 1998; Nahm et al, 2003; Tolbert y Clark, 2003; Bitoun et al, 2009). Además, recientemente se ha realizado un tratamiento con IGF-I en pacientes humanos con ataxia espinocerebelosa, mostrando efectos beneficiosos (Arpa et al, 2011). Todas estas consideraciones nos plantean que el sistema IGF-I podría estar implicado en el desarrollo de enfermedades degenerativas del cerebelo.

Esta tesis está centrada en determinar una posible relación entre el sistema IGF-I y la ruta patogénica de la ataxia de Friedreich. La FRDA está asociada con disfunciones mitocondriales generadas por una reducción de frataxina, una chaperona mitocondrial. A pesar de que nuestro grupo ha mostrado que la administración de IGF-I puede ejercer efectos beneficiosos en todo tipo de ataxia a través de su amplia gama de actividades neuroprotectoras (Fernández et al, 2005), en el caso específico de la FRDA, se podría esperar que el IGF-I module la función de frataxina a través de una modulación de la actividad mitocondrial. Esto estaría respaldado por el hecho de que las mitocondrias del cerebro son dianas importantes del IGF-I (Nishijima et al, 2010), y que éste mejora la actividad mitocondrial (García-Fernández et al, 2008; Bijur y Jope, 2003).

1. Modelos celulares de deficiencia en frataxina

Es importante señalar que existen pocos modelos celulares en los que se pueda estudiar la deficiencia de frataxina (Wong et al, 1999; Wong et al, 2000; Santos et al, 2001; Napoli et al, 2007; Zanella et al, 2008), y que ninguno de éstos utiliza neuronas, las células más afectadas en esta enfermedad. Recientemente se han utilizado células SH-SY5Y diferenciadas (Palomo et al, 2011), que ya es un avance, porque si bien son células tumorales, se han aislado de un tumor del sistema nervioso periférico.

Lo primero que hemos logrado en esta tesis es generar un modelo celular probablemente más útil para poder estudiar lo que ocurre en esta enfermedad. Las neuronas y astrocitos primarios infectados con interferentes de frataxina muestran una reducción importante en los niveles de frataxina, acompañada de un incremento en los niveles de ROS. Estas células fueron viables a tiempos largos, permitiendo estudiar los efectos crónicos de la falta de frataxina.

En la FRDA, se ha considerado que el estrés oxidativo tiene un papel central en el desarrollo de la patología; ya sea porque la frataxina está encargada de la respuesta celular ante aumentos en los niveles de ROS (Chantrel-Groussard et al, 2001; Jiralerspong et al, 2001), o porque éstos se presentan como una consecuencia de la acumulación de hierro en la mitocondria (Adinolfi et al, 2009). A pesar de esto, hay datos que muestran que la falta de frataxina en las células no genera un aumento de ROS (Seznec et al, 2005) y postulan que esta enfermedad neurodegenerativa no está asociada con daño oxidativo. En nuestro modelo, obtenemos un aumento en los niveles de estrés oxidativo en astrocitos y neuronas con bajos niveles de frataxina. Nuestros resultados, así como otros obtenidos por diferentes grupos (Lefevre et al, 2012; Lloren et al, 2007; Calabrese et al, 2005; Bulteau et al, 2007), refuerzan la idea de que el estrés oxidativo sí tiene un papel en la patofisiología de FRDA.

2. IGF-I como agente terapéutico en ataxia de Friedreich

2. 1 IGF-I modula los niveles de frataxina

La ataxia de Friedreich es la más común de las ataxias hereditarias pero, desafortunadamente, a día de hoy no existe ningún tratamiento eficaz para esta patología. Como la FRDA está asociada a una reducción en los niveles de frataxina, una de las principales aproximaciones terapéuticas que está siendo estudiada es aumentar los niveles de esta proteína mitocondrial en las células del

paciente afectado. Además, los niveles de frataxina de los portadores de FRDA (los padres de los pacientes) son menores que los de personas sanas (50,2-64%) (Willis et al, 2008; Deutsch et al, 2010). Los portadores no presentan la sintomatología asociada a esta enfermedad. Es por esto que un incremento modesto en frataxina parece que sería suficiente: al obtenerse niveles de frataxina similares o ligeramente inferiores a los de los portadores, los síntomas podrían desaparecer.

Nuestros resultados *in vitro* son bastante alentadores, ya que muestran que el IGF-I tiene la capacidad de aumentar los niveles de frataxina en astrocitos y neuronas que tienen bajos niveles de FXN. El IGF-I aumenta la frataxina en torno a un 50-100%. Si fuésemos capaces de trasladar esto a la clínica, el incremento de frataxina en los pacientes sería suficiente para que estos obtengan valores similares a los de los portadores y que así, hipotéticamente, reviertan algunos de los síntomas.

En este trabajo, también hemos logrado identificar la ruta de acción por la cual el IGF-I incrementa los niveles de frataxina: PI-3K/AKT/mTor. Esto es importante porque permite evaluar nuevas terapias usando puntos específicos de la misma: se podría evitar una administración directa de IGF-I, ya que ésta tiene como efectos secundarios que estimula la proliferación celular lo cual puede conllevar al posterior desarrollo de un tumor (Gallagher y LeRoith, 2011).

La frataxina es una proteína bastante conservada a lo largo de escala filogenética. Se han encontrado homólogos en diferentes especies como bacterias (Bou-Abdallah et al, 2004), levaduras (Babcock et al, 1997), ratón (Koutnikova et al, 1997), mosca (Canizares et al, 2000) e incluso en plantas (Busi et al, 2004). Sin embargo, es importante señalar que existen importantes diferencias entre el fenotipo de diferentes modelos murinos y de pacientes humanos, así como una gran dificultad para reproducir las características clínicas de FRDA en modelos animales (Cossee et al, 2000; Puccio et al, 2001; Miranda et al, 2002; Al-Mahdawi et al, 2006), lo que hace necesario considerar la posibilidad que existan diferencias en la regulación de la frataxina entre las diferentes especies. Es por esto que un dato importante de esta tesis es que el IGF-I mantuvo su actividad estimuladora en células humanas, específicamente en astrocitos, donde el IGF-I aumentó la FXN en igual magnitud que en los astrocitos de ratón. Esto respalda la idea que este factor sea un potencial agente terapéutico de esta enfermedad.

El IGF-I es reconocido como un importante regulador de la homeostasis de los cardiomiocitos (Suleiman et al, 2007) y se sabe que este factor tiene importantes efectos cardioprotectores

(Sadat et al, 2007; O'Sullivan et al, 2011). En la ataxia de Friedreich, el 70% de los pacientes sufre de cardiopatías (Isnard et al, 2007). Nuestros resultados en cardiomiocitos apoyan el potencial terapéutico del IGF-I por dos motivos. El primero, el IGF-I actúa sobre un tipo celular que está muy afectado en la FRDA; y el segundo, sugiere que el efecto del IGF-I sobre frataxina sería bastante amplio, afectando a muchos tipos celulares (i.e. astrocitos, neuronas, cardiomiocitos).

2.2 IGF-I como mediador de la neuroprotección frente al estrés oxidativo

La muerte celular causada por estrés oxidativo es un aspecto muy importante en la investigación actual sobre enfermedades neurodegenerativas (Beal, 1995). Como hemos señalado anteriormente, en la FRDA, la deficiencia de frataxina ha sido asociada con un aumento en los niveles de estrés oxidativo (Al-Mahdawi et al, 2006; Busi et al, 2006; Vázquez-Manrique et al, 2006), lo que tendría un papel central en la patología. Nuestros experimentos muestran que un tratamiento con IGF-I puede reducir los niveles de estrés oxidativo en astrocitos y neuronas deficientes de frataxina. En estas condiciones, el IGF-I mostró un papel beneficioso frente a un daño oxidativo.

Existe mucha controversia acerca del papel del IGF-I frente al estrés oxidativo. Nuestro grupo ha mostrado que ante niveles altos de estrés oxidativo, el IGF-I pierde su capacidad neuroprotectora (Dávila et al, 2008). Los resultados de esta tesis, por el contrario, mostraron al IGF-I como un agente destoxificante. Una diferencia importante a tener en cuenta es que en el primer caso, es una situación aguda, mientras que en el segundo, es un efecto crónico debido a la falta sostenida de frataxina. De cualquier manera, nuestros datos defienden la importancia del IGF-I como mediador de la neuroprotección frente al estrés oxidativo y concuerdan con lo previamente visto en neuronas de cerebelo e hipotálamo, donde el IGF-I previene la muerte neuronal inducida por estrés oxidativo (Heck et al, 1999; Sortino y Canonico, 1996).

2.3 IGF-I como agente neuroprotector en células deficientes de frataxina

Por otra parte, los estudios realizados con co-cultivos nos han mostrado que el IGF-I es capaz de proteger a las neuronas que no tienen FXN a través de los astrocitos. Si bien el incremento en los niveles de supervivencia es bastante modesto, este resultado es el primero que muestra que la acción del IGF-I puede ser mediada por otras células; en este caso, los astrocitos. Esto señala una nueva opción para combatir la neurodegeneración, la cual sería a través de la potenciación de las propiedades beneficiosas de los astrocitos.

En línea con lo anterior, nuestros resultados también muestran que células no afectadas (en este caso por la falta de frataxina) son capaces de mediar la acción del IGF-I. Esto sugiere que podría haber nuevas vías de acción para este factor trófico. Es necesario profundizar más para saber si existen mecanismos subyacentes que podrían ser utilizados como posibles terapias. Por ejemplo, el IGF-I podría estimular la liberación de factores citoprotectores por los astrocitos que pueden rescatar a astrocitos y neuronas de la ausencia de frataxina. Sin embargo, se necesitan más estudios para ser concluyente.

2.4 IGF-I como tratamiento para ratones YG8R: un modelo murino de FRDA

En esta tesis hemos mostrado que el IGF-I es un factor capaz de aumentar los niveles de frataxina (la proteína que es deficiente en FRDA) y de restaurar los niveles de ROS (uno de los principales componentes de la patología). Adicionalmente, y quizá uno de los puntos más interesante del trabajo, hemos mostrado que un tratamiento con IGF-I en los ratones YG8R, un modelo murino de FRDA, puede recuperar sus déficits en coordinación motora. Esto concuerda con lo previamente descrito en otros animales atáxicos, donde el tratamiento con IGF-I recuperó la coordinación motora (Fernández et al, 1998; Carro et al, 2001; Nahm et al, 2003; Tolbert y Clark, 2003; Bitoun et al, 2009). Tomando estos puntos en cuenta, podríamos considerar al IGF-I como un posible agente terapéutico de la patología. Estos datos muestran que el IGF-I no solamente tuvo efectos a nivel *in vitro*, sino también *in vivo*.

Hubiese sido interesante poder evaluar la efectividad del IGF-I en un ratón que muestre una ataxia más severa; sin embargo, los modelos actuales no nos permiten realizar este experimento, ya que no imitan muchos de los rasgos clínicos de la enfermedad (algo común en la mayoría de modelos experimentales de las enfermedades neurodegenerativas humanas). El ratón YG8R fue generado con la intención de imitar más fielmente esta enfermedad, y se realizó insertando una transgén que porta la frataxina humana -con un número de repeticiones considerado patológico- sobre un fondo genético nulo para la frataxina murina. Inicialmente, este modelo era considerado como uno de los mejores para estudiar la FRDA, aunque ahora se tienen que tener en cuenta diversas cuestiones. Por ejemplo, los mismos autores que lo generaron, han mostrado que los ratones tienen una ataxia moderada (en el papel original mostraban que los ratones presentaban claros signos de ataxia) y que además ésta es dependiente del sexo (Sandi et al, 2011). A pesar de todo, estos ratones siguen siendo considerados como uno de los mejores modelos e incluso, hace muy poco, este mismo grupo los ha empleado para estudiar un tratamiento con interferón gamma (Tomassini et al, 2012). A pesar de la limitación descrita y visto los beneficios evidentes

de la administración de IGF-I en los ratones YG8R, consideramos que estos datos impulsan el uso de IGF-I como agente terapéutico.

Finalmente, es necesario recordar que la ataxia de Friedreich es una enfermedad que no tiene cura, y que estudios preliminares en pacientes con ataxia espinocerebelosa tratados con IGF-I mostraron efectos beneficiosos sobre los mismos (Arpa et al, 2011). Si, además de esto, consideramos los resultados obtenidos en esta tesis (la habilidad que tiene el IGF-I de aumentar frataxina en neuronas y astrocitos deficientes de esta proteína, reducir los niveles de estrés oxidativo en estas mismas células, y restaurar los déficits de coordinación motora en un modelo murino de FRDA), creemos que es razonable proponer al IGF-I como un agente terapéutico en el tratamiento de la ataxia de Friedreich, y comenzar a evaluarlo en pacientes con esta patología.

3. Diferencias en la regulación de frataxina de acuerdo al tipo celular

La frataxina murina, al igual que la humana, se expresa de forma ubicua y es más abundante en tejidos de alto requerimiento energético, como el corazón y la médula. Además, tiene una expresión media en hígado, músculo esquelético y páncreas (Campuzano et al, 1996; Jiralespong et al, 1997). En términos generales, hay una correlación entre la expresión de la FXN y los tejidos más afectados en esta patología. Sin embargo, las diferencias en los patrones de expresión de frataxina van más allá de los tejidos afectados en FRDA. Por ejemplo, el hígado y el músculo esquelético son tejidos con altos niveles de FXN que, sin embargo, se encuentran poco afectados (exceptuando una debilidad muscular variable) en la enfermedad. Estas diferencias podrían atribuirse a que los tejidos más afectados en la patología, además de presentar altos niveles de FXN, son células post-mitóticas (neuronas, cardiomiocitos, células β del páncreas). Esto implicaría que las células no podrían ser remplazadas una vez que mueren, a diferencia de células del hígado o del músculo esquelético (Wells y Ashizawa, 2006). Si bien esta hipótesis parece bastante razonable, aún no podemos explicar cómo ocurre esta expresión diferencial de frataxina. Es por esto que conocer los mecanismos de regulación de frataxina entre diferentes tipos celulares es un paso importante para tener más claridad sobre este tema.

En esta tesis, hemos mostrado que el IGF-I aumenta los niveles de frataxina en astrocitos pero no en neuronas con niveles normales de FXN. Además, cuando los niveles de FXN se encuentran bajos en las células, el IGF-I tiene efectos estimulatorio en ambos tipos celulares (neuronas y astrocitos). Por último, hemos visto que la ruta PI-3K/AKT/mTOR es activada por IGF-I en todos los casos, independientemente del tipo celular, de los niveles basales de frataxina en neuronas, y del

efecto que este factor tenga sobre la frataxina. Estos resultados son muy interesantes porque muestran un efecto diferencial del IGF-I en neuronas, que parece ser dependiente de los niveles basales de FXN en las mismas, y que no se debe a la ruta de acción del IGF-I, ya que ésta se encuentra activa en ambos casos. Entonces, resulta coherente pensar que la falta de efecto del IGF-I en neuronas y astrocitos normales recaería en alguna diferencia en la regulación de frataxina entre estos dos tipos celulares.

Al evaluar lo que ocurre en condiciones basales, obtuvimos que los niveles de frataxina, tanto proteicos como de mRNA, son mayores en neuronas que en astrocitos. Esto se debería a una mayor necesidad de esta chaperona mitocondrial por parte de las neuronas, que son la diana principal de esta enfermedad. Además, si tomamos en consideración que la frataxina es una proteína que se degrada vía proteosoma (Rufini et al, 2011), y que cuando se inhibe la síntesis proteica los niveles de frataxina caen mucho más rápido en neuronas que en astrocitos (mostrando que la vida media de frataxina es más corta en neuronas que en astrocitos), es lógico pensar que el proteosoma se encuentra más activo en neuronas que en astrocitos. Esto lo confirmamos cuando inhibimos el proteosoma, estimulamos las células con IGF-I, y obtuvimos que sólo las neuronas responden aumentando los niveles de frataxina.

En conjunto, estos datos sugieren que en condiciones basales hay una clara diferencia en la regulación de esta proteína entre ambos tipos celulares: los niveles de frataxina estarían mucho más regulados en neuronas, y tendrían un umbral de regulación mucho más alto que en astrocitos (y probablemente que en otros tipos de células también). Esta situación sería alcanzada a través de un equilibrio entre una síntesis muy elevada de frataxina y una degradación continua. Cuando este equilibrio se rompe, se evidencian las acciones estimuladoras de IGF-I y vemos que las neuronas son capaces de responder a este factor. Es por esto que las neuronas con bajos niveles de frataxina o con el proteosoma inhibido pueden aumentar los niveles de frataxina tras la adición de IGF-I.

Por último, se han identificado diferentes factores de transcripción que están regulando la actividad del promotor del gen de la frataxina (Li et al, 2010; Oktay et al, 2007), y se ha visto que la regulación del promotor es dependiente del hierro (Li et al, 2008). Por otro lado, nuestra interpretación predice que la actividad del promotor de frataxina en neuronas será mayor que en otros tipos celulares. Es por esto, que sería interesante identificar elementos que regulen diferencialmente el gen de frataxina entre diferentes tipos celulares para evaluarlos como posibles opciones terapéuticas.

4. Deficiencia de frataxina en astrocitos

Actualmente, los astrocitos han dejado de ser considerados únicamente como células de soporte neuronal para ser reconocidos como actores importantes de diferentes neuropatologías. Se ha visto que disfunciones en la astroglia, o incluso en funciones específicas de los astrocitos (i.e. impedimento en el transporte del glutamato), están involucradas con muchas enfermedades neurológicas (Seifert et al., 2006; Maragakis y Rothstein, 2006). Por ejemplo, en la esclerosis lateral amiotrófica existen abundantes pruebas de que las anomalías y disfunciones fisiológicas en la astroglia preceden a la enfermedad clínica. Estos cambios incluyen una astrocitosis reactiva que puede ser anterior a la degeneración de neuronas motoras (Brujin et al, 1997), y/o una pérdida en el transporte de glutamato mediado por los astrocitos que, también, ocurre antes de que se manifiesten los síntomas clínicos o que se produzca la degeneración de las neuronas motoras (Howland et al, 2002). Tomando esto en cuenta, es posible que en pacientes con FRDA, la falta de frataxina en astrocitos origine alteraciones cerebrales en etapas tempranas, y que éstas eventualmente generen alguno de los síntomas clínicos.

Los primeros síntomas de FRDA aparecen entre los 5-15 años de edad (Albin, 2003), cuando el desarrollo del cerebro ha concluido. Sin embargo, durante la infancia y pubertad, y hasta llegar al periodo adulto, se dan refinamientos en circuitos neuronales que generan cambios comportamentales durante la adolescencia (Galván et al, 2006). En este contexto, la deficiencia de frataxina, no sólo en neuronas sino también en astrocitos y otras células gliales, podría afectar estos refinamientos. Por ejemplo, se sabe que los impedimentos neurológicos durante el inicio de la enfermedad aparecen en los núcleos periféricos, y que es allí donde se encuentra las células de Schwann (que son las que envuelven a las neuronas del ganglio de la raíz dorsal). Se ha visto también que la deficiencia de frataxina en dichas células serían un elemento clave en la patología de FRDA, ya que la falta de FXN en este tipo celular desencadena cambios inflamatorios y muerte de las mismas (Lu et al., 2009). Tomando en cuenta que estas células son equivalentes a los astrocitos, pero en el sistema nervioso periférico, es razonable pensar que los astrocitos serían igual de importantes en esta patología.

La generación del ratón FAsKO, que carece de frataxina en astrocitos, permitió estudiar las consecuencias de la falta de frataxina *in vivo*. Este ratón presentó un fenotipo extremo: ataxia severa, atrofia generalizada del cerebro, y muerte prematura. Es importante señalar que el ratón FAsKO, no imitó ninguna de las principales características de la neuropatología de la enfermedad: no presentó una reducción en los ganglios de la raíz dorsal tras ser normalizados por el peso del

animal, los niveles de frataxina no estuvieron disminuidos en corazón e hígado, no mostró depósitos de hierro –al menos en el cerebelo que es donde lo hemos evaluado- y mostró una atrofia marcada del cerebelo, lo que no es característico de esta patología, entre otras.

Es interesante señalar que la falta total de frataxina parece ser igual de importante en astrocitos y neuronas, al menos durante el desarrollo del organismo y en los primeros días post nacimiento. Esto se deduce de lo similar que resultan los fenotipos del ratón que no tiene frataxina en neuronas (generado por el grupo de Puccio) y nuestro ratón FAsKO. Ambos ratones exhiben características parecidas: muerte prematura (en torno al día 25), reducción en el peso corporal, y signos de ataxia severos que aparecen alrededor de P12 (Puccio et al, 2001).

4.1 Vulnerabilidad selectiva del cerebelo tras la ablación de frataxina en astrocitos

Históricamente, los astrocitos han sido estudiados como un grupo homogéneo de células. Sin embargo, cada vez es más aceptado que existe una heterogeneidad en dicho tipo celular, no sólo en las diferentes regiones del cerebro sino también dentro de las mismas. Se han mostrado diferencias en su morfología, perfil de expresión génica, propiedades fisiológicas y funciones, así como en la respuesta que tienen frente lesiones y enfermedades. Por ejemplo, utilizando un ratón que carece de EGFR, se han identificado dos poblaciones funcionalmente distintas de astrocitos que podrían explicar el mecanismo por el cual ocurre una neurodegeneración en una región específica del cerebro (Wagner et al, 2006). Estas consideraciones nos han llevado a pensar que la vulnerabilidad selectiva del cerebelo en el FAsKO podría ser explicada por un papel diferencial de la falta de frataxina en astrocitos procedentes de diferentes regiones.

En la misma línea, las proteínas o genes involucrados en el sistema enzimático de defensa celular contra la producción de ROS mostraron diferencias entre el cerebelo y el telencéfalo. Las SOD1 y SOD2 estuvieron aumentadas únicamente en el cerebelo de los ratones FASKO. Además, los dos genes de respuesta al estrés oxidativo que evaluamos fueron regulados con mayor intensidad en el cerebelo que en el telencéfalo. Esto muestra que el telencéfalo se encuentra afectado por la falta de frataxina, pero que este efecto es mucho más moderado del que vemos en el cerebelo. Esto podría sugerir que los astrocitos procedentes de cada región presentan perfiles de expresión génica distintos (al menos en el sistema celular de defensa contra ROS), y podrían explicar las diferencias que vemos entre ambas regiones.

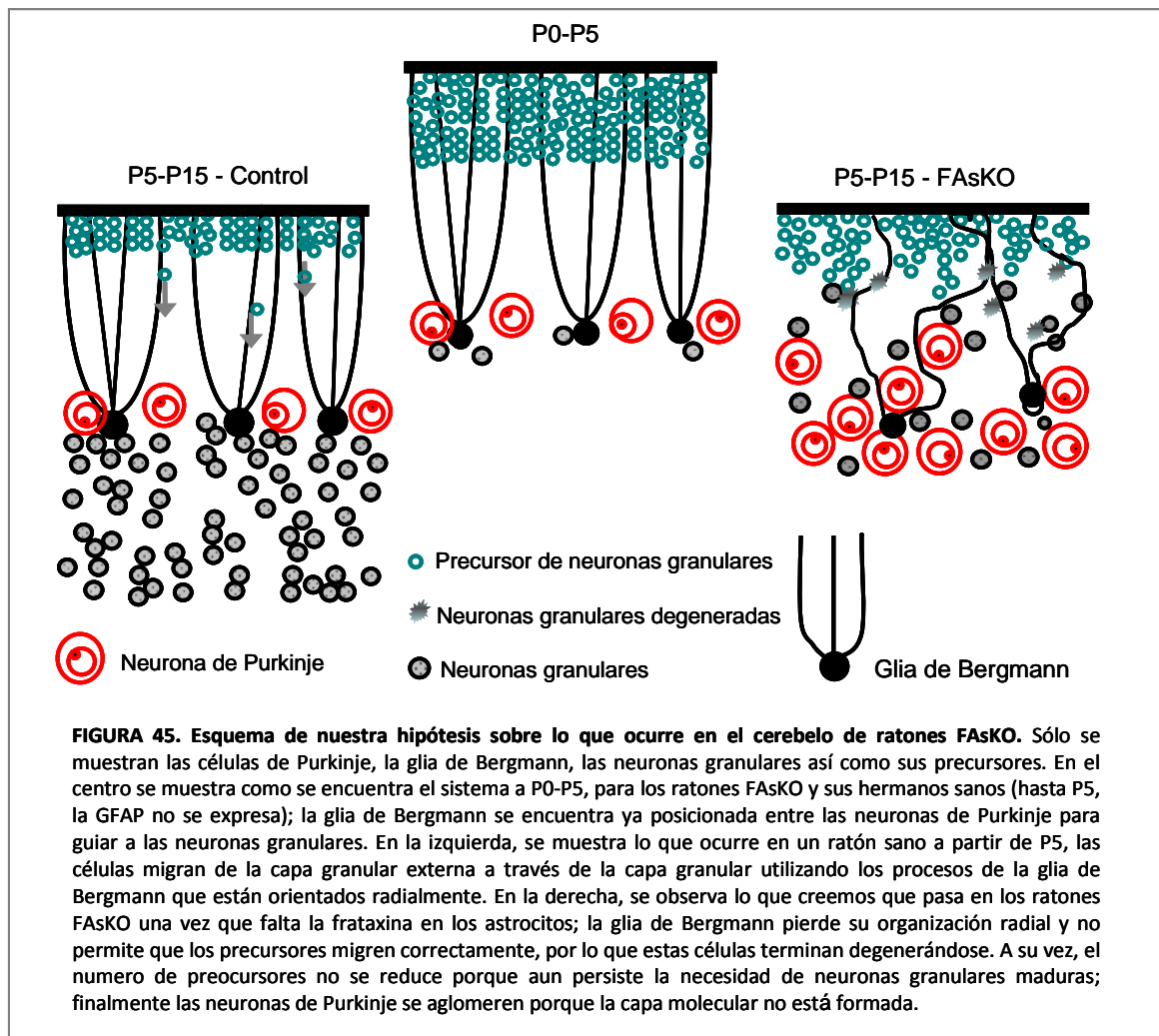
Otra hipótesis para explicar la vulnerabilidad selectiva del cerebelo a la falta de frataxina en astrocitos podría ser la siguiente. El cerebelo es una estructura que se desarrolla después del nacimiento y en los FAsKO se muestra que éste fue más vulnerable a la falta de frataxina que otras áreas del cerebro. Esto se podría deberse a que utilizamos el promotor GFAP para producir la delección de frataxina, y a que éste comienza a expresarse sobretodo después del nacimiento, lo que coincide con el desarrollo del cerebelo.

Los FAsKO presentaron una marcada reducción en el número de neuronas granulares. Además, hemos visto que en el cerebelo existe una gran reducción en los niveles de NeuN (marcador de neuronas maduras), acompañada de un incremento en los niveles de β -3tubulina (marcador de neuronas inmaduras). La proliferación de las neuronas granulares comienza con el nacimiento y alcanza su máximo en P8-P10 (Altman y Bayer, 1987). Se ha mostrado que la GFAP no se expresa en los primeros días tras el nacimiento, pero a P7 los niveles ya son marcadamente altos (Bovolenta et al, 1984). Y por último, conocemos como se generan los diferentes tipos celulares a lo largo del tiempo en el circuito local del cerebelo (Sudarov et al, 2011). Por su parte, el FAsKO presentó también un incremento importante en los niveles de GFAP (un marcador de astrocitos reactivos), lo que genera anomalías en el funcionamiento neuronal, debido a que los astrocitos tienen un papel muy importante en la migración y diferenciación neuronal (Vernadakis, 1996).

Teniendo en cuenta todo esto, hemos generado la siguiente hipótesis: la falta de frataxina afecta la organización radial de la glia de Bergmann, y por ende, las neuronas granulares no son capaces de migrar correctamente hacia la capa molecular interna. Esto genera una reducción en las neuronas maduras, acompañada de un incremento en las neuronas no diferenciadas, ya que los neuroblastos continúan generando neuronas, pero éstas son incapaces de llegar a la capa molecular interna (**figura 45**). Para poder confirmar esta hipótesis, es necesario desarrollar estudios adicionales.

4.2 Relación de la frataxina y el sistema IGF-I

El cerebelo es una de las áreas del SNC que tiene mayor contenido de IGF-I durante la etapa adulta. Diferentes componentes del sistema IGF-I se encuentran alterados en muchas de las enfermedades neurodegenerativas tales como diferentes tipos de ataxia cerebelosa o Alzheimer (Fernández et al, 1998; Carro et al, 2004). Específicamente en la ataxia cerebelosa, se ha visto que



la desregulación de la vía de señalización del sistema IGF-I como es un hecho recurrente en diferentes modelos murinos y pacientes con ataxia cerebelosa. También se ha visto que pacientes con ataxia de Friedreich presentan resistencia a la insulina (Coppola et al, 2009), una condición muchas veces asociada con una alteración en la regulación del sistema IGF-I (Dunger et al, 2004). Con estas consideraciones en mente, evaluamos el sistema IGF-I en el FAsKO.

A pesar de que este ratón no imita la enfermedad, presenta aspectos relevantes a tener en cuenta; por ejemplo, que la falta de frataxina, en un único tipo celular del cerebro, es capaz de modular marcadamente los niveles séricos de IGF-I. El IGF-I en suero de los FAsKO es la mitad que en sus controles. Este resultado apoya lo previamente publicado, que muestra que pacientes atáxicos, por diferentes patologías, tienen una reducción en más de un 60% de los niveles de IGF-I en sangre (Torres-Alemán et al, 1996). Es interesante señalar que este estudio constó de 7 pacientes de los cuales 2 fueron pacientes de FRDA. Por esto, es razonable suponer que pacientes

con FRDA también tendrían el sistema IGF-I afectado. Sin embargo, es necesario evaluar el sistema en un número significativo de pacientes FRDA, para poder afirmarlo.

Por otra parte, evaluamos el sistema IGF-I en el cerebro. Un dato interesante es que el cerebro mostró estar completamente desregulado en el cerebelo, pero no en telencéfalo. Los niveles de mRNA de IGF-I están aumentados y los de IGFBP5 (la proteína de unión más abundante en el cerebelo) disminuidos. Además, los niveles proteicos de IGFIR están también elevados. Podemos intentar explicar estas diferencias en la desregulación del sistema IGF-I entre el cerebelo y el telencéfalo a través de una de éstas dos opciones. La primera recaería sobre el efecto diferencial de la falta de frataxina entre los astrocitos del cerebelo en comparación con los del telencéfalo. La segunda en cambio, tiene que ver con los patrones de expresión del IGF-I: el mRNA del IGF-I se encuentra ampliamente distribuido cuando el SNC está en desarrollo; sin embargo, después del nacimiento, el mRNA del IGF-I es particularmente abundante en el cerebelo y en el bulbo olfatorio, regiones del cerebro donde aún persiste la neurogénesis (Bartlett et al, 1991). Es más, el IGF-I presenta niveles de expresión máximos en el cerebelo durante las primeras dos semanas de vida del ratón, los que coinciden temporalmente con la expresión de la IGFBP5 (Bach et al, 1991; Bartlett et al, 1991; Stenvers et al, 1994; Ye y D'Ercole, 1997). Considerando lo descrito, podemos interpretar los resultados de la siguiente manera: el cerebelo tiene una mayor necesidad de IGF-I, por lo que aumenta la síntesis de este péptido (a diferencia del telencéfalo) y, a su vez, disminuye los niveles de IGFBP5 para que el IGF-I pueda estar disponible y así activar a su receptor, que está aumentado para intentar maximizar los efectos de esta hormona.

Por último, para intentar explicar porqué los niveles de IGF-I sérico están bajos, existen dos alternativas. La primera, que se debería a la entrada masiva del IGF-I circulante al cerebro para cumplir funciones específicas en el cerebelo. La segunda, que el cerebelo esté teniendo una respuesta adaptativa a la falta de IGF-I en sangre. La primera opción fue descartada porque los niveles de mRNA de IGF-I en hígado están reducidos en comparación con los controles. Esto quiere decir que los niveles séricos no se encuentran disminuidos debido a que el IGF-I está siendo importado al cerebro sino porque la síntesis del IGF-I circulante está afectada. Entonces, la más probable sería que el cerebelo este aumentando la síntesis de IGF-I para intentar maximizar los efectos de esta molécula en esta estructura como una respuesta adaptativa del sistema a la necesidad de mayores niveles de este péptido. De todas maneras, resulta curioso que la falta de frataxina en un único tipo celular afecte a todo el sistema de esta manera.

En diversos tipos de ataxia cerebelosas, es común encontrar una desregulación del sistema IGF-I como evento secundario, tanto en modelos murinos como en pacientes humanos. Dicha desregulación es parte de una cascada patológica de muerte neuronal que podría ser objeto de potenciales terapias (Fernández et al, 2005; Gatchel et al, 2008). Tomando en cuenta la importante desregulación que presentan los FAsKO en el sistema IGF-I, realizamos un tratamiento con IGF-I en ratones P7 (antes de que manifiesten los síntomas).

El tratamiento con IGF-I parece mejorar la coordinación motora de los FAsKO, retardando el desarrollo de la patología. Es importante señalar que, en esta primera etapa, no hemos realizado una prueba comportamental que nos permita cuantificar esta mejoría. Sin embargo, en los videos 2 y 3 (donde se muestra los FAsKO +/- IGF-I) se ve un aumento de la movilidad en los animales tratados. Estos datos concuerdan con lo previamente descrito en otros modelos murinos de ataxia cerebelosa, en los que un tratamiento con IGF-I también tuvo efectos beneficiosos en el funcionamiento del cerebelo. El IGF-I parece estar implicado en todo tipo de enfermedades degenerativas del cerebelo independientemente de su origen (Carro et al, 2001; Fernández et al, 1998; Nahm et al, 2003; Tolbert y Clark, 2003; Bitoun et al, 2009).

Los ratones FAsKO se caracterizaron por una muerte prematura. En los estudios histológicos que realizamos, se muestra una clara reducción en el número de neuronas granulares y una desorganización en las neuronas de Purkinje. Además, se conoce que el IGF-I está involucrado en la proliferación de las neuronas granulares (Fernández et al, 2010; Tanori et al, 2010), y también en la supervivencia de las células de Purkinje en el cerebelo. Aún quedan varios experimentos pendientes para poder entender mejor qué causa la muerte prematura en el FAsKO; pero con lo que sabemos, pensamos que la explicación más probable sería que la falta de frataxina afecta la organización radial de la glia de Bergmann, lo que conlleva a una reducción en las neuronas granulares maduras (**figura 45**). A su vez, esta disminución en el número de neuronas granulares generaría como efecto secundario una pérdida de neuronas de Purkinje y de neuronas de los núcleos profundos debido a la falta de conexiones neuronales apropiadas (Herrup y Trenkner, 1987; Smeyne y Goldowitz, 1989; Maricich et al, 1997; Zhong et al, 2005).

Es importante señalar que en etapas tempranas del proceso neurodegenerativo, mecanismos de neuroprotección (como la entrada de IGF-I sérico al cerebro) han permitido que aquellos animales que se ejercitan recuperen parte de su comportamiento normal, mientras que los sedentarios siguen estando afectados (Carro et al, 2001). Por eso, sería interesante evaluar si el tratamiento

con IGF-I en combinación con el ejercicio (forzado, ya que son animales que tienen poca movilidad) mejoraría aún más la coordinación motora de los FAsKO.

El tratamiento con IGF-I aumentó la supervivencia de los FAsKO en más de un 70%. A pesar de que se han realizado numerosos estudios con la finalidad de investigar los efectos del IGF-I en neurodegeneración y en disfunciones del cerebelo, aún no se conoce los mecanismos subyacentes a dicho efecto en animales atáxicos. Como hemos comentado anteriormente, creemos que la muerte temprana del animal es causada por una pérdida masiva de neuronas granulares. Basados en esto, consideramos que el IGF-I actuaría sobre la proliferación de neuronas granulares, ya que este factor ha sido involucrado en su proliferación (Fernández et al, 2010; Tanori et al, 2010).

En conclusión, si bien todavía queda mucho camino por recorrer dentro de la investigación de la ataxia de Friedreich, el presente trabajo aporta contundente evidencia para respaldar el uso del IGF-I como posible terapia en esta enfermedad, que a día de hoy no tiene cura.

CONCLUSIONES

1. El IGF-I mostró ser un potencial agente terapéutico para la ataxia de Friedreich, ya que estimuló frataxina y normalizó los niveles de ROS en neuronas y astrocitos con bajos niveles de FXN, además de restaurar la coordinación motora en un modelo murino de FRDA con ataxia moderada.
2. En neuronas, el IGF-I aumenta los niveles de frataxina sólo cuando éstos se encuentran bajos, o cuando el proteosoma está inhibido. En astrocitos, en cambio, el IGF-I siempre incrementa frataxina. Además, este efecto lo realiza via PI-3K/AKT/mTOR.
3. El efecto estimulador del IGF-I parece estar conservado entre diferentes especies y tipos celulares. En nuestros experimentos, el IGF-I aumentó los niveles de frataxina en diferentes células de ratón (astrocitos, neuronas y cardiomiocitos), así como en células humanas, específicamente en astrocitos.
4. El IGF-I ejerce sus efectos neuroprotectores sobre neuronas deficientes de frataxina a través de la acción de los astrocitos. Así mismo, las células no afectadas (en este caso con niveles normales de frataxina) son capaces de mediar la acción del IGF-I y aumentar los niveles de frataxina para ejercer efectos beneficiosos en el resto de la población.
5. Existen diferencias en la regulación de frataxina entre astrocitos y neuronas: los niveles basales de frataxina se encuentran aumentados en neuronas y su vida media es mucho más corta en comparación con astrocitos. Estas diferencias sugieren que la degradación vía proteosoma se encontraría más activa en neuronas.
6. La frataxina en astrocitos tendría un papel fundamental en el desarrollo del cerebro, lo que estaría evidenciado al comprobar: ataxia severa, muerte temprana y atrofia generalizada del cerebro, particularmente en el cerebelo, en los ratones carentes de frataxina en astrocitos (FAsKO).
7. El ratón FAsKO muestra una vulnerabilidad selectiva del cerebelo, a la falta de frataxina en astrocitos, lo que estaría evidenciado por una desregulación del sistema IGF-I , una reducción de las neuronas maduras acompañado de un aumento en neuronas inmaduras así como cambios más profundos en genes de respuesta al estrés oxidativo en cerebelo en comparación con el telencéfalo.

8. Un tratamiento con IGF-I a los FAsKO es suficiente para aumentar la esperanza de vida así como para mejorar la actividad motora de estos ratones.

BIBLIOGRAFÍA

- Acquaviva, Fabio, Imma Castaldo, Alessandro Filla, Manuela Giacchetti, Daniele Marmolino, Antonella Monticelli, Michele Pinelli, Francesco Saccà, and Sergio Coccozza. 2008. Recombinant human erythropoietin increases frataxin protein expression without increasing mrna expression. *Cerebellum* 7 (3): 360-5.
- Adamec, J, F Rusnak, W G Owen, S Naylor, L M Benson, A M Gacy, and G Isaya. 2000. Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: Implications for friedreich ataxia. *Am J Hum Genet* 67 (3): 549-62.
- Adinolfi, Salvatore, Clara Iannuzzi, Filippo Prischi, Chiara Pastore, Stefania Iametti, Stephen R Martin, Franco Bonomi, and Annalisa Pastore. 2009. Bacterial frataxin cyay is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by iscs. *Nat Struct Mol Biol* 16 (4): 390-6.
- Albin, Roger L. 2003. Dominant ataxias and friedreich ataxia: An update. *Curr Opin Neurol* 16 (4): 507-14.
- Albiston, A L and A C Herington. 1992. Tissue distribution and regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 messenger ribonucleic acid (mrna) in the rat: Comparison with IGF-I mrna expression. *Endocrinology* 130 (1): 497-502.
- Aleman, A, H J Verhaar, E H De Haan, W R De Vries, M M Samson, M L Drent, E A Van der Veen, and H P Koppeschaar. 1999. Insulin-like growth factor-i and cognitive function in healthy older men. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (2): 471-5.
- Al-Mahdawi, Sahar, Ricardo Mouro Pinto, Dhaval Varshney, Lorraine Lawrence, Margaret B Lowrie, Sian Hughes, Zoe Webster, et al. 2006. GAA repeat expansion mutation mouse models of friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* 88 (5): 580-90.
- Al-Mahdawi, Sahar, Ricardo Mouro Pinto, Piers Ruddle, Christopher Carroll, Zoe Webster, and Mark Pook. 2004. GAA repeat instability in friedreich ataxia YAC transgenic mice. *Genomics* 84 (2): 301-10.
- Aloria, Kerman, Brenda Schilke, Amy Andrew, and Elizabeth A Craig. 2004. Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO Rep* 5 (11): 1096-101.
- Altman, J and S A Bayer. 1987. Development of the precerebellar nuclei in the rat: III. The posterior precerebellar extramural migratory stream and the lateral reticular and external cuneate nuclei. *J Comp Neurol* 257 (4): 513-28.
- Arpa, J, et al, 2011. Subcutaneous insulin-like growth factor-1 treatment in spinocerebellar ataxias: An open label clinical trial. *Mov Disord* 26 (2): 358-359
- Avruch, J. 1998. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182 (1-2): 31-48.
- Babcock, M, D de Silva, R Oaks, S Davis-Kaplan, S Jiralerspong, L Montermini, M Pandolfo, and J Kaplan. 1997. Regulation of mitochondrial iron accumulation by yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 276 (5319): 1709-12.

- Bach, M A, Z Shen-Orr, W L Lowe, C T Roberts, and D LeRoith. 1991. Insulin-like growth factor I mrna levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 10 (1): 43-8.
- Barbieri, Michelangela, Massimiliano Bonafè, Claudio Franceschi, and Giuseppe Paolisso. 2003. Insulin/igf-i-signaling pathway: An evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285 (5): E1064-71.
- Bartlett, W P, X S Li, M Williams, and S Benkovic. 1991. Localization of insulin-like growth factor-1 mrna in murine central nervous system during postnatal development. *Dev Biol* 147 (1): 239-50.
- Beal, M F. 1995. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 38 (3): 357-66.
- Beck, K D, L Powell-Braxton, H R Widmer, J Valverde, and F Hefti. 1995. Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron* 14 (4): 717-30.
- Bencze, Krisztina Z, Kalyan C Kondapalli, Jeremy D Cook, Stephen McMahon, César Millán-Pacheco, Nina Pastor, and Timothy L Stemmler. 2006. The structure and function of frataxin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41 (5): 269-91.
- De Biase, Irene, Astrid Rasmussen, Antonella Monticelli, Sahar Al-Mahdawi, Mark Pook, Sergio Coccozza, and Sanjay I Bidichandani. 2007. Somatic instability of the expanded GAA triplet-repeat sequence in friedreich ataxia progresses throughout life. *Genomics* 90 (1): 1-5.
- Bijur, Gautam N and Richard S Jope. 2003. Rapid accumulation of akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem* 87 (6): 1427-35.
- Bit-Avragim, N, A Perrot, L Schöls, C Hardt, F R Kreuz, C Zühlke, S Bubel, et al. 2001. The GAA repeat expansion in intron 1 of the frataxin gene is related to the severity of cardiac manifestation in patients with friedreich's ataxia. *J Mol Med (Berl)* 78 (11): 626-32.
- Bitoun, Emmanuelle, Mattéa J Finelli, Peter L Oliver, Sheena Lee, and Kay E Davies. 2009. AF4 is a critical regulator of the IGF-1 signaling pathway during purkinje cell development. *J Neurosci* 29 (49): 15366-74.
- Blair, L A and J Marshall. 1997. IGF-1 modulates N and L calcium channels in a PI 3-kinase-dependent manner. *Neuron* 19 (2): 421-9.
- Boddaert, Nathalie, Kim Hanh Le Quan Sang, Agnès Rötig, Anne Leroy-Willig, Serge Gallet, Francis Brunelle, Daniel Sidi, Jean-Christophe Thalabard, Arnold Munnich, and Z loav Cabantchik. 2007. Selective iron chelation in friedreich ataxia: Biologic and clinical implications. *Blood* 110 (1): 401-8.
- Bondy, C A. 1991. Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J Neurosci* 11 (11): 3442-55.

- Bondy, C A and W H Lee. 1993. Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Ann N Y Acad Sci* 692:33-43.
- Bou-Abdallah, Fadi, Salvatore Adinolfi, Annalisa Pastore, Thomas M Laue, and N Dennis Chasteen. 2004. Iron binding and oxidation kinetics in frataxin cyay of escherichia coli. *J Mol Biol* 341 (2): 605-15.
- Bovolenta, P, R K Liem, and C A Mason. 1984. Development of cerebellar astroglia: Transitions in form and cytoskeletal content. *Dev Biol* 102 (1): 248-59.
- Branda, S S, P Cavadini, J Adamec, F Kalousek, F Taroni, and G Isaya. 1999. Yeast and human frataxin are processed to mature form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase. *J Biol Chem* 274 (32): 22763-9.
- Brera, B, A Serrano, and M L de Ceballos. 2000. Beta-amyloid peptides are cytotoxic to astrocytes in culture: A role for oxidative stress. *Neurobiol Dis* 7 (4): 395-405.
- Brooks, G, R A Poolman, C J McGill, and J M Li. 1997. Expression and activities of cyclins and cyclin-dependent kinases in developing rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29 (8): 2261-71.
- Bruijn, L I, M W Becher, M K Lee, K L Anderson, N A Jenkins, N G Copeland, S S Sisodia, et al. 1997. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with sod1-containing inclusions. *Neuron* 18 (2): 327-38.
- Brywe, Katarina G, Carina Mallard, Malin Gustavsson, Maj Hedtjärn, Anna-Lena Leverin, Xiaoyang Wang, Klas Blomgren, Jörgen Isgaard, and Henrik Hagberg. 2005. IGF-I neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of akt and gsk3beta? *Eur J Neurosci* 21 (6): 1489-502.
- Bulteau, Anne-Laure, Andrew Dancis, Monique Gareil, Jean-Jacques Montagne, Jean-Michel Camadro, and Emmanuel Lesuisse. 2007. Oxidative stress and protease dysfunction in the yeast model of friedreich ataxia. *Free Radic Biol Med* 42 (10): 1561-70.
- Busi, Maria V, Eduardo J Zabaleta, Alejandro Araya, and Diego F Gomez-Casati. 2004. Functional and molecular characterization of the frataxin homolog from arabidopsis thaliana. *FEBS Lett* 576 (1-2): 141-4.
- Busi, Maria V, María V Maliandi, Hugo Valdez, Marina Clemente, Eduardo J Zabaleta, Alejandro Araya, and Diego F Gomez-Casati. 2006. Deficiency of arabidopsis thaliana frataxin alters activity of mitochondrial fe-s proteins and induces oxidative stress. *Plant J* 48 (6): 873-82.
- Busiguina, S, A M Fernandez, V Barrios, R Clark, D L Tolbert, J Berciano, and I Torres-Aleman. 2000. Neurodegeneration is associated to changes in serum insulin-like growth factors. *Neurobiol Dis* 7 (6 Pt B): 657-65.
- Calabrese, Vittorio, Raffaele Lodi, Caterina Tonon, Velia D'Agata, Maria Sapienza, Giovanni Scapagnini, Andrea Mangiameli, Giovanni Pennisi, A M Giuffrida Stella, and D Allan Butterfield. 2005. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* 233 (1-2): 145-62.

- Campuzano, V, L Montermini, M D Moltò, L Pianese, M Cossée, F Cavalcanti, E Monros, et al. 1996. Friedreich's ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271 (5254): 1423-7.
- Campuzano, V, L Montermini, Y Lutz, L Cova, C Hindelang, S Jiralerspong, Y Trottier, et al. 1997. Frataxin is reduced in friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet* 6 (11): 1771-80.
- Cañizares, J, J M Blanca, J A Navarro, E Monrós, F Palau, and M D Moltó. 2000. Dfh is a drosophila homolog of the friedreich's ataxia disease gene. *Gene* 256 (1-2): 35-42.
- Carrascosa, C, I Torres-Aleman, C Lopez-Lopez, E Carro, L Espejo, S Torrado, and J J Torrado. 2004. Microspheres containing insulin-like growth factor I for treatment of chronic neurodegeneration. *Biomaterials* 25 (4): 707-14.
- Carro, E, A Nuñez, S Busiguina, and I Torres-Aleman. 2000. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci* 20 (8): 2926-33.
- Carro, E, J L Trejo, S Busiguina, and I Torres-Aleman. 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* 21 (15): 5678-84.
- Carro, E, J L Trejo, T Gomez-Isla, D LeRoith, and I Torres-Aleman. 2002. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 8 (12): 1390-7.
- Carro, Eva, Carlos Spuch, Jose Luis Trejo, Desiré Antequera, and Ignacio Torres-Aleman. 2005. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J Neurosci* 25 (47): 10884-93.
- Carro, Eva and Ignacio Torres-Aleman. 2004a. Insulin-like growth factor I and alzheimer's disease: Therapeutic prospects? *Expert Rev Neurother* 4 (1): 79-86.
- Carro, Eva and Ignacio Torres-Aleman. 2004b. The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 490 (1-3): 127-33.
- Carro, Eva and Ignacio Torres-Aleman. 2006. Serum insulin-like growth factor I in brain function. *Keio J Med* 55 (2): 59-63.
- Casella, S J, E P Smith, J J van Wyk, D R Joseph, M A Hynes, E C Hoyt, and P K Lund. 1987. Isolation of rat testis cdnas encoding an insulin-like growth factor I precursor. *DNA* 6 (4): 325-30.
- De Castro, M, J García-Planells, E Monrós, J Cañizares, R Vázquez-Manrique, J J Vílchez, M Urtasun, et al. 2000. Genotype and phenotype analysis of friedreich's ataxia compound heterozygous patients. *Hum Genet* 106 (1): 86-92.
- Ceda, G P, E Dall'Aglio, M Maggio, F Lauretani, S Bandinelli, C Falzoi, W Grimaldi, et al. 2005. Clinical implications of the reduced activity of the GH-IGF-I axis in older men. *J Endocrinol Invest* 28 (11 Suppl Proceedings): 96-100.

- Chamberlain, S, J Shaw, A Rowland, J Wallis, S South, Y Nakamura, A von Gabain, M Farrall, and R Williamson. 1988. Mapping of mutation causing friedreich's ataxia to human chromosome 9. *Nature* 334 (6179): 248-50.
- Chan, S J, Q P Cao, and D F Steiner. 1990. Evolution of the insulin superfamily: Cloning of a hybrid insulin/insulin-like growth factor cdna from amphioxus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (23): 9319-23.
- Chantrel-Groussard, K, V Geromel, H Puccio, M Koenig, A Munnich, A Rötig, and P Rustin. 2001. Disabled early recruitment of antioxidant defenses in friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 10 (19): 2061-7.
- Chrysis, D, A S Calikoglu, P Ye, and A J D'Ercole. 2001. Insulin-like growth factor-i overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of bcl family proteins in a developmentally specific manner. *J Neurosci* 21 (5): 1481-9.
- Ciucci, Francesca, Elena Putignano, Laura Baroncelli, Silvia Landi, Nicoletta Berardi, and Lamberto Maffei. 2007. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mediates the effects of enriched environment (EE) on visual cortical development. *PLoS One* 2 (5): e475.
- Clancy, D J, D Gems, L G Harshman, S Oldham, H Stocker, E Hafen, S J Leivers, and L Partridge. 2001. Extension of life-span by loss of CHICO, a drosophila insulin receptor substrate protein. *Science* 292 (5514): 104-6.
- Cobb, M H and E J Goldsmith. 1995. How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270 (25): 14843-6.
- Cohen, Ehud and Andrew Dillin. 2008. The insulin paradox: Aging, proteotoxicity and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 9 (10): 759-67.
- Coppola, Giovanni, Daniele Marmolino, Daning Lu, Qing Wang, Miriam Cnop, Myriam Rai, Fabio Acquaviva, Sergio Cocozza, Massimo Pandolfo, and Daniel H Geschwind. 2009. Functional genomic analysis of frataxin deficiency reveals tissue-specific alterations and identifies the ppargamma pathway as a therapeutic target in friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 18 (13): 2452-61.
- Corpas, E, S M Harman, and M R Blackman. 1993. Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev* 14 (1): 20-39.
- Cossée, M, H Puccio, A Gansmuller, H Koutnikova, A Dierich, M LeMeur, K Fischbeck, P Dollé, and M Koenig. 2000. Inactivation of the friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet* 9 (8): 1219-26.
- Datta, S R, A Brunet, and M E Greenberg. 1999. Cellular survival: A play in three akts. *Genes Dev* 13 (22): 2905-27.
- Daughaday, W H and P Rotwein. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 10 (1): 68-91.
- Davies, A M, K F Lee, and R Jaenisch. 1993. P75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins. *Neuron* 11 (4): 565-74.

- Dávila, David and Ignacio Torres-Aleman. 2008. Neuronal death by oxidative stress involves activation of FOXO3 through a two-arm pathway that activates stress kinases and attenuates insulin-like growth factor I signaling. *Mol Biol Cell* 19 (5): 2014-25.
- D'Ercole, A J. 1996. Insulin-like growth factors and their receptors in growth. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25 (3): 573-90.
- D'Ercole, A J, P Ye, A S Calikoglu, and G Gutierrez-Ospina. 1996. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 13 (3): 227-55.
- D'Ercole, A J, Z Dai, Y Xing, C Boney, M B Wilkie, J M Lauder, V K Han, and D R Clemmons. 1994. Brain growth retardation due to the expression of human insulin like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: An in vivo model for the analysis of igf function in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 82 (1-2): 213-22.
- D'Ercole, A Joseph, Ping Ye, and John R O'Kusky. 2002. Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system. *Neuropeptides* 36 (2-3): 209-20.
- Desai, Mina, Tie Li, and Michael G Ross. 2011. Fetal hypothalamic neuroprogenitor cell culture: Preferential differentiation paths induced by leptin and insulin. *Endocrinology* 152 (8): 3192-201.
- Deutsch, Eric C, Avni B Santani, Susan L Perlman, Jennifer M Farmer, Catherine A Stolle, Michael F Marusich, and David R Lynch. 2010. A rapid, noninvasive immunoassay for frataxin: Utility in assessment of friedreich ataxia. *Mol Genet Metab* 101 (2-3): 238-45.
- Dews, M, M Prisco, F Peruzzi, G Romano, A Morrione, and R Baserga. 2000. Domains of the insulin-like growth factor I receptor required for the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Endocrinology* 141 (4): 1289-300.
- D'Mello, S R, K Borodetz, and S P Soltoff. 1997. Insulin-like growth factor and potassium depolarization maintain neuronal survival by distinct pathways: Possible involvement of PI 3-kinase in IGF-1 signaling. *J Neurosci* 17 (5): 1548-60.
- Doré, S, S Bastianetto, S Kar, and R Quirion. 1999. Protective and rescuing abilities of IGF-I and some putative free radical scavengers against beta-amyloid-inducing toxicity in neurons. *Ann N Y Acad Sci* 890:356-64.
- Doré, S, S Kar, and R Quirion. 1997. Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against beta-amyloid- and human amylin-induced toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (9): 4772-7.
- Duan, Cunming and Qijin Xu. 2005. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen Comp Endocrinol* 142 (1-2): 44-52.
- Duby, Geoffrey, Françoise Foury, Anna Ramazzotti, Johannes Herrmann, and Thomas Lutz. 2002. A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum Mol Genet* 11 (21): 2635-43.

- Dudek, H, S R Datta, T F Franke, M J Birnbaum, R Yao, G M Cooper, R A Segal, D R Kaplan, and M E Greenberg. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase akt. *Science* 275 (5300): 661-5.
- Dull, T, R Zufferey, M Kelly, R J Mandel, M Nguyen, D Trono, and L Naldini. 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72 (11): 8463-71.
- Dunger, David, Kevin Yuen, and Ken Ong. 2004. Insulin-like growth factor I and impaired glucose tolerance. *Horm Res* 62 Suppl 1:101-7.
- Dürr, A, M Cossee, Y Agid, V Campuzano, C Mignard, C Penet, J L Mandel, A Brice, and M Koenig. 1996. Clinical and genetic abnormalities in patients with friedreich's ataxia. *N Engl J Med* 335 (16): 1169-75.
- Espinós-Armero, C, P González-Cabo, and F Palau-Martínez. 2005. [Autosomal recessive cerebellar ataxias. Their classification, genetic features and pathophysiology]. *Rev Neurol* 41 (7): 409-22.
- Fernandez, A M, A G de la Vega, and I Torres-Aleman. 1998. Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (3): 1253-8.
- Fernandez, A M, A G Gonzalez de la Vega, B Planas, and I Torres-Aleman. 1999. Neuroprotective actions of peripherally administered insulin-like growth factor I in the injured olivo-cerebellar pathway. *Eur J Neurosci* 11 (6): 2019-30.
- Fernandez, A M, E M Carro, C Lopez-Lopez, and I Torres-Aleman. 2005. Insulin-like growth factor I treatment for cerebellar ataxia: Addressing a common pathway in the pathological cascade? *Brain Res Brain Res Rev* 50 (1): 134-41.
- Fernandez, A M, J Garcia-Estrada, L M Garcia-Segura, and I Torres-Aleman. 1997. Insulin-like growth factor I modulates c-fos induction and astrocytosis in response to neurotoxic insult. *Neuroscience* 76 (1): 117-22.
- Fernandez, Ana M, Silvia Fernandez, Paloma Carrero, Miguel Garcia-Garcia, and Ignacio Torres-Aleman. 2007. Calcineurin in reactive astrocytes plays a key role in the interplay between proinflammatory and anti-inflammatory signals. *J Neurosci* 27 (33): 8745-56.
- Fernandez, Ana M and Ignacio Torres-Alemán. 2012. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci* 13 (4): 225-39.
- Fernandez, Carla, Valérie M Tatard, Nicolas Bertrand, and Nadia Dahmane. 2010. Differential modulation of sonic-hedgehog-induced cerebellar granule cell precursor proliferation by the IGF signaling network. *Dev Neurosci* 32 (1): 59-70.
- Finocchiaro, G, G Baio, P Micossi, G Pozza, and S di Donato. 1988. Glucose metabolism alterations in friedreich's ataxia. *Neurology* 38 (8): 1292-6.
- Follenzi, Antonia and Luigi Naldini. 2002a. Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors. *Methods Enzymol* 346:454-65.

- Follenzi, Antonia and Luigi Naldini. 2002b. HIV-based vectors. Preparation and use. *Methods Mol Med* 69:259-74.
- Foury, Françoise, Annalisa Pastore, and Mathieu Trincal. 2007. Acidic residues of yeast frataxin have an essential role in Fe-S cluster assembly. *EMBO Rep* 8 (2): 194-9.
- Gakh, Oleksandr, Jiri Adamec, A Marquis Gacy, Ray D Twosten, Whyte G Owen, and Grazia Isaya. 2002. Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry* 41 (21): 6798-804.
- Gakh, Oleksandr, Sungjo Park, Gang Liu, Lee Macomber, James A Imlay, Gloria C Ferreira, and Grazia Isaya. 2006. Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Hum Mol Genet* 15 (3): 467-79.
- Gallagher, Emily J and Derek LeRoith. 2011. Minireview: IGF, insulin, and cancer. *Endocrinology* 152 (7): 2546-51.
- Galli, C, O Meucci, A Scorziello, T M Werge, P Calissano, and G Schettini. 1995. Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: The involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J Neurosci* 15 (2): 1172-9.
- Galvan, Adriana, Todd A Hare, Cindy E Parra, Jackie Penn, Henning Voss, Gary Glover, and B J Casey. 2006. Earlier development of the accumbens relative to orbitofrontal cortex might underlie risk-taking behavior in adolescents. *J Neurosci* 26 (25): 6885-6892. Web.
- Garcia, J V, M P Stoppelli, K L Thompson, S J Decker, and M R Rosner. 1987. Characterization of a drosophila protein that binds both epidermal growth factor and insulin-related growth factors. *J Cell Biol* 105 (1): 449-56.
- García-Fernández, María, Gloria Delgado, Juan Enrique Puche, Salvador González-Barón, and Inma Castilla Cortázar. 2008. Low doses of insulin-like growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats. *Endocrinology* 149 (5): 2433-42.
- Gatchel, Jennifer R and Huda Y Zoghbi. 2005. Diseases of unstable repeat expansion: Mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* 6 (10): 743-55.
- Gerber, Jana, Ulrich Mühlenhoff, and Roland Lill. 2003. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep* 4 (9): 906-11.
- Goncalves, Sergio, Vincent Paupe, Emmanuel P Dassa, and Pierre Rustin. 2008. Deferiprone targets aconitase: Implication for Friedreich's ataxia treatment. *BMC Neurol* 8:20.
- Gonda, Yuko, Hitoshi Sakurai, Yukio Hirata, Hidenori Tabata, Itsuki Ajioka, and Kazunori Nakajima. 2007. Expression profiles of insulin-like growth factor binding protein-like 1 in the developing mouse forebrain. *Gene Expr Patterns* 7 (4): 431-40.

- Gonzalez de la Vega, A, W Buño, S Pons, M S Garcia-Calderat, E Garcia-Galloway, and I Torres-Aleman. 2001. Insulin-like growth factor I potentiates kainate receptors through a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway. *Neuroreport* 12 (6): 1293-6.
- Greene, Eriko, Lata Mahishi, Ali Entezam, Daman Kumari, and Karen Usdin. 2007. Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res* 35 (10): 3383-90.
- Grønborg, M, B S Wulff, J S Rasmussen, T Kjeldsen, and S Gammeltoft. 1993. Structure-function relationship of the insulin-like growth factor-i receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 268 (31): 23435-40.
- Hausse, A O, Y Aggoun, D Bonnet, D Sidi, A Munnich, A Rötig, and P Rustin. 2002. Idebenone and reduced cardiac hypertrophy in friedreich's ataxia. *Heart* 87 (4): 346-9.
- Hay, Nissim and Nahum Sonenberg. 2004. Upstream and downstream of mtor. *Genes Dev* 18 (16): 1926-45.
- Heck, S, F Lezoualc'h, S Engert, and C Behl. 1999. Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappab. *J Biol Chem* 274 (14): 9828-35.
- Herman, David, Kai Jenssen, Ryan Burnett, Elisabetta Soragni, Susan L Perlman, and Joel M Gottesfeld. 2006. Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol* 2 (10): 551-8.
- Hernández-Sánchez, C, A López-Carranza, C Alarcón, E J de La Rosa, and F de Pablo. 1995. Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: Local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (21): 9834-8.
- Herrup, K and E Trenkner. 1987. Regional differences in cytoarchitecture of the weaver cerebellum suggest a new model for weaver gene action. *Neuroscience* 23 (3): 871-85.
- Holzenberger, Martin, Joëlle Dupont, Bertrand Ducos, Patricia Leneuve, Alain Géloën, Patrick C Even, Pascale Cervera, and Yves Le Bouc. 2003. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421 (6919): 182-7.
- Howland, David S, Jian Liu, Yijin She, Beth Goad, Nicholas J Maragakis, Benjamin Kim, Jamie Erickson, et al. 2002. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (3): 1604-9.
- Huang, Danshan, Michelle Khoe, Merone Befekadu, Sue Chung, Yasunori Takata, Dusko Ilic, and Michael Bryer-Ash. 2007. Focal adhesion kinase mediates cell survival via nf-kappab and ERK signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 292 (4): C1339-52.
- Humbel, R E. 1990. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 190 (3): 445-62.

- Hurtado-Chong, Anahí, María J Yusta-Boyo, Eva Vergaño-Vera, Alessandro Bulfone, Flora de Pablo, and Carlos Vicario-Abejón. 2009. IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone. *Eur J Neurosci* 30 (5): 742-55.
- Hwa, V, Y Oh, and R G Rosenfeld. 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20 (6): 761-87.
- Isaya, G, H A O'Neill, O Gakh, S Park, R Mantcheva, and S M Mooney. 2004. Functional studies of frataxin. *Acta Paediatr Suppl* 93 (445): 68-71; discussion 72-3.
- Isnard, R, H Kalotka, A Dürr, M Cossée, M Schmitt, F Pousset, D Thomas, A Brice, M Koenig, and M Komajda. 1997. Correlation between left ventricular hypertrophy and GAA trinucleotide repeat length in friedreich's ataxia. *Circulation* 95 (9): 2247-9.
- Jiralerspong, S, B Ge, T J Hudson, and M Pandolfo. 2001. Manganese superoxide dismutase induction by iron is impaired in friedreich ataxia cells. *FEBS Lett* 509 (1): 101-5.
- Jiralerspong, S, Y Liu, L Montermini, S Stifani, and M Pandolfo. 1997. Frataxin shows developmentally regulated tissue-specific expression in the mouse embryo. *Neurobiol Dis* 4 (2): 103-13.
- Kajimoto, Y and P Rotwein. 1989. Structure and expression of a chicken insulin-like growth factor I precursor. *Mol Endocrinol* 3 (12): 1907-13.
- Kakhlon, Or, Hila Manning, William Breuer, Naomi Melamed-Book, Chunye Lu, Gino Cortopassi, Arnold Munnich, and Z loav Cabantchik. 2008. Cell functions impaired by frataxin deficiency are restored by drug-mediated iron relocation. *Blood* 112 (13): 5219-27.
- Kang, Barinder P S, Arunas Urbonas, Andrew Baddoo, Stuart Baskin, Ashwani Malhotra, and Leonard G Meggs. 2003. IGF-1 inhibits the mitochondrial apoptosis program in mesangial cells exposed to high glucose. *Am J Physiol Renal Physiol* 285 (5): F1013-24.
- Kapeller, R and L C Cantley. 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays* 16 (8): 565-76.
- Kappeler, Laurent, Carlos De Magalhaes Filho, Joëlle Dupont, Patricia Leneuve, Pascale Cervera, Laurence Périn, Catherine Loudes, et al. 2008. Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism. *PLoS Biol* 6 (10): e254.
- Karlberg, Tobias, Ulrika Schagerlöf, Oleksandr Gakh, Sungjo Park, Ulf Ryde, Martin Lindahl, Kirstin Leath, Elspeth Garman, Grazia Isaya, and Salam Al-Karadaghi. 2006. The structures of frataxin oligomers reveal the mechanism for the delivery and detoxification of iron. *Structure* 14 (10): 1535-46.
- Kondo, T, T Kitano, K Iwai, M Watanabe, Y Taguchi, T Yabu, H Umehara, N Domae, T Uchiyama, and T Okazaki. 2002. Control of ceramide-induced apoptosis by IGF-1: Involvement of PI-3 kinase, caspase-3 and catalase. *Cell Death Differ* 9 (6): 682-92.

- Koutnikova, H, V Campuzano, F Foury, P Dollé, O Cazzalini, and M Koenig. 1997. Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet* 16 (4): 345-51.
- Laemmli, U K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-5.
- Lagedrost, Sarah J, Martin St John Sutton, Meryl S Cohen, Gary M Satou, Beth D Kaufman, Susan L Perlman, Christian Rummey, Thomas Meier, and David R Lynch. 2011. Idebenone in friedreich ataxia cardiomyopathy-results from a 6-month phase III study (IONIA). *Am Heart J* 161 (3): 639-645.e1.
- Lee, W H, G M Wang, T Lo, L C Triarhou, and B Ghetti. 1995. Altered IGFBP5 gene expression in the cerebellar external germinal layer of weaver mutant mice. *Brain Res Mol Brain Res* 30 (2): 259-68.
- Lefevre, Sophie, Dominika Sliwa, Pierre Rustin, Jean-Michel Camadro, and Renata Santos. 2012. Oxidative stress induces mitochondrial fragmentation in frataxin-deficient cells. *Biochem Biophys Res Commun* 418 (2): 336-41.
- Leininger, Gina M, Carey Backus, Michael D Uhler, Stephen I Lentz, and Eva L Feldman. 2004. Phosphatidylinositol 3-kinase and akt effectors mediate insulin-like growth factor-i neuroprotection in dorsal root ganglia neurons. *FASEB J* 18 (13): 1544-6.
- LeRoith, D. 2000. Insulin-like growth factor I receptor signaling--overlapping or redundant pathways? *Endocrinology* 141 (4): 1287-8.
- LeRoith, D, H Werner, D Beitner-Johnson, and C T Roberts. 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16 (2): 143-63.
- LeRoith, D, H Werner, T N Faria, H Kato, M Adamo, and C T Roberts. 1993. Insulin-like growth factor receptors. Implications for nervous system function. *Ann N Y Acad Sci* 692:22-32.
- Le Roith, D, L Scavo, and A Butler. 2001. What is the role of circulating IGF-I? *Trends Endocrinol Metab* 12 (2): 48-52.
- LeRoith, Derek and Charles T Roberts. 2003. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 195 (2): 127-37.
- Levi, S, B Corsi, M Bosisio, R Invernizzi, A Volz, D Sanford, P Arosio, and J Drysdale. 2001. A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem* 276 (27): 24437-40.
- Li, Kuanyu, Anamika Singh, Daniel R Crooks, Xiaoman Dai, Zhuangzhuang Cong, Liang Pan, Dung Ha, and Tracey A Rouault. 2010. Expression of human frataxin is regulated by transcription factors SRF and TFAP2. *PLoS One* 5 (8): e12286.
- Li, Kuanyu, Edward K Besse, Dung Ha, Gennadiy Kovtunovych, and Tracey A Rouault. 2008. Iron-dependent regulation of frataxin expression: Implications for treatment of friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* 17 (15): 2265-73.

- Liu, J P, J Baker, A S Perkins, E J Robertson, and A Efstratiadis. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (igf-1) and type 1 IGF receptor (igf1r). *Cell* 75 (1): 59-72.
- Liu, X F, J R Fawcett, R G Thorne, T A DeFor, and W H Frey. 2001. Intranasal administration of insulin-like growth factor-i bypasses the blood-brain barrier and protects against focal cerebral ischemic damage. *J Neurol Sci* 187 (1-2): 91-7.
- Livak, K J and T D Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 25 (4): 402-8.
- Llorens, José V, Juan A Navarro, Maria J Martínez-Sebastián, Mary K Baylies, S Schneuwly, José A Botella, and Maria D Moltó. 2007. Causative role of oxidative stress in a drosophila model of friedreich ataxia. *FASEB J* 21 (2): 333-44.
- Lodi, R, J M Cooper, J L Bradley, D Manners, P Styles, D J Taylor, and A H Schapira. 1999. Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with friedreich ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (20): 11492-5.
- Lopez-Lopez, C, D LeRoith, and I Torres-Aleman. 2004. Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (26): 9833-8.
- Lowe, W L, C T Roberts, S R Lasky, and D LeRoith. 1987. Differential expression of alternative 5' untranslated regions in mRNAs encoding rat insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (24): 8946-50.
- Lowe, W L, S R Lasky, D LeRoith, and C T Roberts. 1988. Distribution and regulation of rat insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids encoding alternative carboxyterminal e-peptides: Evidence for differential processing and regulation in liver. *Mol Endocrinol* 2 (6): 528-35.
- Lu, Chunye, Robert Schoenfeld, Yuxi Shan, Hsing-Jo Tsai, Bruce Hammock, and Gino Cortopassi. 2009. Frataxin deficiency induces schwann cell inflammation and death. *Biochim Biophys Acta* 1792 (11): 1052-61.
- Lynch, C D, D Lyons, A Khan, S A Bennett, and W E Sonntag. 2001. Insulin-like growth factor-1 selectively increases glucose utilization in brains of aged animals. *Endocrinology* 142 (1): 506-9.
- Manning, Brendan D and Lewis C Cantley. 2007. AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell* 129 (7): 1261-74.
- Maragakis, Nicholas J and Jeffrey D Rothstein. 2006. Mechanisms of disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2 (12): 679-89.
- Maricich, S M, J Soha, E Trenkner, and K Herrup. 1997. Failed cell migration and death of purkinje cells and deep nuclear neurons in the weaver cerebellum. *J Neurosci* 17 (10): 3675-83.
- Marmolino, Daniele. 2011. Friedreich's ataxia: Past, present and future. *Brain Res Rev* 67 (1-2): 311-30.

- Marmolino, Daniele, Fabio Acquaviva, Michele Pinelli, Antonella Monticelli, Imma Castaldo, Alessandro Filla, and Sergio Cocozza. 2009. PPAR-gamma agonist azelaoyl PAF increases frataxin protein and mrna expression: New implications for the friedreich's ataxia therapy. *Cerebellum* 8 (2): 98-103.
- Mather, M and H Rottenberg. 2000. Aging enhances the activation of the permeability transition pore in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 273 (2): 603-8.
- Miranda, Carlos J, Manuela M Santos, Keiichi Ohshima, Julie Smith, Liangtao Li, Michaeline Bunting, Mireille Cossée, et al. 2002. Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett* 512 (1-3): 291-7.
- Murphy, Coleen T, Steven A McCarroll, Cornelia I Bargmann, Andrew Fraser, Ravi S Kamath, Julie Ahringer, Hao Li, and Cynthia Kenyon. 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of caenorhabditis elegans. *Nature* 424 (6946): 277-83.
- Mühlenhoff, Ulrich, Nadine Richhardt, Jana Gerber, and Roland Lill. 2002a. Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. A requirement for ATP, NADH, and reduced iron. *J Biol Chem* 277 (33): 29810-6.
- Mühlenhoff, Ulrich, Nadine Richhardt, Michael Ristow, Gyula Kispal, and Roland Lill. 2002b. The yeast frataxin homolog yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular fe/S proteins. *Hum Mol Genet* 11 (17): 2025-36.
- Naeve, G S, A M Vana, J R Eggold, G Verge, N Ling, and A C Foster. 2000. Expression of rat insulin-like growth factor binding protein-6 in the brain, spinal cord, and sensory ganglia. *Brain Res Mol Brain Res* 75 (2): 185-97.
- Nahm, Sang-Soep, Tamy C Frank, Michelle D Browning, Jarita M Sepulvado, Jill K Hiney, and Louise C Abbott. 2003. Insulin-like growth factor-i improves cerebellar dysfunction but does not prevent cerebellar neurodegeneration in the calcium channel mutant mouse, leaner. *Neurobiol Dis* 14 (2): 157-65.
- Nair, Margie, Salvatore Adinolfi, Chiara Pastore, Geoff Kelly, Pierandrea Temussi, and Annalisa Pastore. 2004. Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, cyay: Mapping the iron binding sites. *Structure* 12 (11): 2037-48.
- Napoli, Eleonora, Dexter Morin, Rita Bernhardt, Alan Buckpitt, and Gino Cortopassi. 2007. Hemin rescues adrenodoxin, heme a and cytochrome oxidase activity in frataxin-deficient oligodendroglioma cells. *Biochim Biophys Acta* 1772 (7): 773-80.
- Napoli, Eleonora, Franco Taroni, and Gino A Cortopassi. 2006. Frataxin, iron-sulfur clusters, heme, ROS, and aging. *Antioxid Redox Signal* 8 (3-4): 506-16.
- Ness, Jennifer K, Russell C Scaduto, and Teresa L Wood. 2004. IGF-I prevents glutamate-mediated bax translocation and cytochrome C release in O4+ oligodendrocyte progenitors. *Glia* 46 (2): 183-94.
- Niikura, T, Y Hashimoto, T Okamoto, Y Abe, T Yasukawa, M Kawasumi, T Hiraki, et al. 2001. Insulin-like growth factor I (IGF-I) protects cells from apoptosis by alzheimer's V642I mutant amyloid precursor protein through IGF-I receptor in an igf-binding protein-sensitive manner. *J Neurosci* 21 (6): 1902-10.

- Nishijima, Takeshi, Joaquin Piriz, Sylvie Duflot, Ana M Fernandez, Gema Gaitan, Ulises Gomez-Pinedo, Jose M Garcia Verdugo, et al. 2010. Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-i into the CNS. *Neuron* 67 (5): 834-46.
- Nuñez, Angel, Eva Carro, and Ignacio Torres-Aleman. 2003. Insulin-like growth factor I modifies electrophysiological properties of rat brain stem neurons. *J Neurophysiol* 89 (6): 3008-17.
- Ocrant, I, C T Fay, and J T Parmelee. 1990. Characterization of insulin-like growth factor binding proteins produced in the rat central nervous system. *Endocrinology* 127 (3): 1260-7.
- Offen, D, B Shtatif, D Hadad, A Weizman, E Melamed, and I Gil-Ad. 2001. Protective effect of insulin-like-growth-factor-1 against dopamine-induced neurotoxicity in human and rodent neuronal cultures: Possible implications for parkinson's disease. *Neurosci Lett* 316 (3): 129-32.
- Ohshima, K, L Montermini, R D Wells, and M Pandolfo. 1998. Inhibitory effects of expanded GAA.TTC triplet repeats from intron I of the friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. *J Biol Chem* 273 (23): 14588-95.
- Oishi, Koji, Kenji Watatani, Yasuhiro Itoh, Hideyuki Okano, François Guillemot, Kazunori Nakajima, and Yukiko Gotoh. 2009. Selective induction of neocortical gabaergic neurons by the pdk1-akt pathway through activation of mash1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (31): 13064-9.
- Oktay, Yavuz, Elhadji Dioum, Satoshi Matsuzaki, Kan Ding, Liang-Jun Yan, Ronald G Haller, Luke I Szveda, and Joseph A Garcia. 2007. Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates expression of the mitochondrial aconitase chaperone protein frataxin. *J Biol Chem* 282 (16): 11750-6.
- O'Kusky, John Robert, Ping Ye, and A Joseph D'Ercole. 2003. Increased expression of insulin-like growth factor I augments the progressive phase of synaptogenesis without preventing synapse elimination in the hypoglossal nucleus. *J Comp Neurol* 464 (3): 382-91.
- O'Kusky, J R, P Ye, and A J D'Ercole. 2000. Insulin-like growth factor-i promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J Neurosci* 20 (22): 8435-42.
- O'Neill, Heather A, Oleksandr Gakh, Sungjo Park, Jin Cui, Steven M Mooney, Matthew Sampson, Gloria C Ferreira, and Grazia Isaya. 2005. Assembly of human frataxin is a mechanism for detoxifying redox-active iron. *Biochemistry* 44 (2): 537-45.
- O'Sullivan, John F, Anne-Laure Leblond, Geraldine Kelly, Arun H S Kumar, Pat Metharom, Chirlei K Büneker, Niki Alizadeh-Vikali, et al. 2011. Potent long-term cardioprotective effects of single low-dose insulin-like growth factor-1 treatment postmyocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv* 4 (4): 327-35.

- Ozdinler, P Hande and Jeffrey D Macklis. 2006. IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat Neurosci* 9 (11): 1371-81.
- Palau, F. 2001. Friedreich's ataxia and frataxin: Molecular genetics, evolution and pathogenesis (review). *Int J Mol Med* 7 (6): 581-9.
- Palau, Francesc and Carmen Espinós. 2006. Autosomal recessive cerebellar ataxias. *Orphanet J Rare Dis* 1:47.
- Palomo, Gloria M, Toñi Cerrato, Ricardo Gargini, and Javier Diaz-Nido. 2011. Silencing of frataxin gene expression triggers p53-dependent apoptosis in human neuron-like cells. *Hum Mol Genet* 20 (14): 2807-22.
- Pandini, Giuseppe, Francesco Frasca, Rossana Mineo, Laura Sciacca, Riccardo Vigneri, and Antonino Belfiore. 2002. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem* 277 (42): 39684-95.
- Pandolfo, M. 1999. Friedreich's ataxia: Clinical aspects and pathogenesis. *Semin Neurol* 19 (3): 311-21.
- Pandolfo, Massimo. 2008. Friedreich ataxia. *Arch Neurol* 65 (10): 1296-303.
- Park, Sungjo, Oleksandr Gakh, Heather A O'Neill, Arianna Mangravita, Helen Nichol, Gloria C Ferreira, and Grazia Isaya. 2003. Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *J Biol Chem* 278 (33): 31340-51.
- Pollak, Michael N. 2004. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Novartis Found Symp* 262:84-98; discussion 98-107, 265-8.
- Pomplun, Doreen, Anja Voigt, Tim J Schulz, René Thierbach, Andreas F Pfeiffer, and Michael Ristow. 2007. Reduced expression of mitochondrial frataxin in mice exacerbates diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (15): 6377-81.
- Puccio, H, D Simon, M Cossée, P Criqui-Filipe, F Tiziano, J Melki, C Hindelang, R Matyas, P Rustin, and M Koenig. 2001. Mouse models for friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and fe-s enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* 27 (2): 181-6.
- Puccio, Hélène. 2009. Multicellular models of friedreich ataxia. *J Neurol* 256 Suppl 1:18-24.
- Puche, Juan E, María García-Fernández, Jordi Muntané, José Rioja, Salvador González-Barón, and Inma Castilla Cortazar. 2008. Low doses of insulin-like growth factor-i induce mitochondrial protection in aging rats. *Endocrinology* 149 (5): 2620-7.
- Rai, Myriam, Elisabetta Soragni, Kai Jenssen, Ryan Burnett, David Herman, Giovanni Coppola, Daniel H Geschwind, Joel M Gottesfeld, and Massimo Pandolfo. 2008. HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a friedreich ataxia mouse model. *PLoS One* 3 (4): e1958.

- Ramsey, M M, J L Weiner, T P Moore, C S Carter, and W E Sonntag. 2004. Growth hormone treatment attenuates age-related changes in hippocampal short-term plasticity and spatial learning. *Neuroscience* 129 (1): 119-27.
- Reinhardt, R R and C A Bondy. 1994. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology* 135 (5): 1753-61.
- Richardson, Des R, Darius J R Lane, Erika M Becker, Michael L-H Huang, Megan Whitnall, Yohan Suryo Rahmanto, Alex D Sheftel, and Prem Ponka. 2010. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (24): 10775-82.
- Rinderknecht, E and R E Humbel. 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253 (8): 2769-76.
- Ristow, Michael, Hindrik Mulder, Doreen Pomplun, Tim J Schulz, Katrin Müller-Schmehl, Anja Krause, Malin Fex, et al. 2003. Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of beta cell mass. *J Clin Invest* 112 (4): 527-34.
- Rufini, Alessandra, Silvia Fortuni, Gaetano Arcuri, Ivano Condò, Dario Serio, Ottaviano Incani, Florence Malisan, Natascia Ventura, and Roberto Testi. 2011. Preventing the ubiquitin-proteasome-dependent degradation of frataxin, the protein defective in friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 20 (7): 1253-61.
- Russo, V C, P D Gluckman, E L Feldman, and G A Werther. 2005. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev* 26 (7): 916-43.
- Rustin, P, J C von Kleist-Retzow, K Chantrel-Groussard, D Sidi, A Munnich, and A Rötig. 1999. Effect of idebenone on cardiomyopathy in friedreich's ataxia: A preliminary study. *Lancet* 354 (9177): 477-9.
- Sadat, Sanga, Sebastian Gehmert, Yao-Hua Song, Yasheng Yen, Xiaowen Bai, Sebastian Gaiser, Helmut Klein, and Eckhard Alt. 2007. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 363 (3): 674-9.
- Sanchez-Calderon, Hortensia, Lourdes Rodriguez-de la Rosa, Marta Milo, Jose G Pichel, Matthew Holley, and Isabel Varela-Nieto. 2010. RNA microarray analysis in prenatal mouse cochlea reveals novel IGF-I target genes: Implication of MEF2 and FOXM1 transcription factors. *PLoS One* 5 (1): e8699.
- Sandi, Chiranjeevi, Ricardo Mouro Pinto, Sahar Al-Mahdawi, Vahid Ezzatizadeh, Glenn Barnes, Steve Jones, James R Rusche, Joel M Gottesfeld, and Mark A Pook. 2011. Prolonged treatment with pimelic o-aminobenzamide HDAC inhibitors ameliorates the disease phenotype of a friedreich ataxia mouse model. *Neurobiol Dis* 42 (3): 496-505.
- Santos, M M, K Ohshima, and M Pandolfo. 2001. Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Hum Mol Genet* 10 (18): 1935-44.

- Sarbassov, D D, David A Guertin, Siraj M Ali, and David M Sabatini. 2005. Phosphorylation and regulation of akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307 (5712): 1098-101.
- Sarbassov, Dos D and David M Sabatini. 2005. Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *J Biol Chem* 280 (47): 39505-9.
- Schmucker, Stéphane and Hélène Puccio. 2010. Understanding the molecular mechanisms of Friedreich's ataxia to develop therapeutic approaches. *Hum Mol Genet* 19 (R1): R103-10.
- Seguin, Alexandra, Aurélien Bayot, Andrew Dancis, Adelina Rogowska-Wrzesinska, Françoise Auchère, Jean-Michel Camadro, Anne-Laure Bulteau, and Emmanuel Lesuisse. 2009. Overexpression of the yeast frataxin homolog (yfh1): Contrasting effects on iron-sulfur cluster assembly, heme synthesis and resistance to oxidative stress. *Mitochondrion* 9 (2): 130-8.
- Sehat, Bitu, Ali Tofigh, Yingbo Lin, Eric Trocmé, Ulrika Liljedahl, Jens Lagergren, and Olle Larsson. 2010. SUMOylation mediates the nuclear translocation and signaling of the IGF-1 receptor. *Sci Signal* 3 (108): ra10.
- Seifert, Gerald, Karl Schilling, and Christian Steinhäuser. 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: A molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7 (3): 194-206.
- Sekulić, A, C C Hudson, J L Homme, P Yin, D M Otterness, L M Karnitz, and R T Abraham. 2000. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-akt signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res* 60 (13): 3504-13.
- Seto, D, W-H Zheng, A McNicoll, B Collier, R Quirion, and S Kar. 2002. Insulin-like growth factor-I inhibits endogenous acetylcholine release from the rat hippocampal formation: Possible involvement of GABA in mediating the effects. *Neuroscience* 115 (2): 603-12.
- Seznec, Hervé, Delphine Simon, Cécile Bouton, Laurence Reutenauer, Ariane Hertzog, Pawel Golik, Vincent Procaccio, et al. 2005. Friedreich ataxia: The oxidative stress paradox. *Hum Mol Genet* 14 (4): 463-74.
- Seznec, Hervé, Delphine Simon, Laurent Monassier, Paola Criqui-Filipe, Anne Gansmuller, Pierre Rustin, Michel Koenig, and Hélène Puccio. 2004. Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* 13 (10): 1017-24.
- Shahrabani-Gargir, Limor, Tej K Pandita, and Haim Werner. 2004. Ataxia-telangiectasia mutated gene controls insulin-like growth factor I receptor gene expression in a deoxyribonucleic acid damage response pathway via mechanisms involving zinc-finger transcription factors Sp1 and WT1. *Endocrinology* 145 (12): 5679-87.
- Shepherd, P R, D J Withers, and K Siddle. 1998. Phosphoinositide 3-kinase: The key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333 (Pt 3): 471-90.

- Simon, Delphine, Hervé Seznec, Anne Gansmuller, Nadège Carelle, Philipp Weber, Daniel Metzger, Pierre Rustin, Michel Koenig, and Hélène Puccio. 2004. Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J Neurosci* 24 (8): 1987-95.
- Smeyne, R J and D Goldowitz. 1989. Development and death of external granular layer cells in the weaver mouse cerebellum: A quantitative study. *J Neurosci* 9 (5): 1608-20.
- Sonntag, W E, C D Lynch, S A Bennett, A S Khan, P L Thornton, P T Cooney, R L Ingram, T McShane, and J K Brunso-Bechtold. 1999. Alterations in insulin-like growth factor-1 gene and protein expression and type 1 insulin-like growth factor receptors in the brains of ageing rats. *Neuroscience* 88 (1): 269-79.
- Sortino, M A and P L Canonico. 1996. Neuroprotective effect of insulin-like growth factor I in immortalized hypothalamic cells. *Endocrinology* 137 (4): 1418-22.
- Sosa, Lucas, Sebastian Dupraz, Lisandro Laurino, Flavia Bollati, Mariano Bisbal, Alfredo Cáceres, Karl H Pfenninger, and Santiago Quiroga. 2006. IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat Neurosci* 9 (8): 993-5.
- Steinkellner, Hannes, Barbara Scheiber-Mojdehkar, Hans Goldenberg, and Brigitte Sturm. 2010. A high throughput electrochemiluminescence assay for the quantification of frataxin protein levels. *Anal Chim Acta* 659 (1-2): 129-32.
- Stenvers, K L, E M Zimmermann, M Gallagher, and P K Lund. 1994. Expression of insulin-like growth factor binding protein-4 and -5 mRNAs in adult rat forebrain. *J Comp Neurol* 339 (1): 91-105.
- Sturm, B, D Stupphann, C Kaun, S Boesch, M Schranzhofer, J Wojta, H Goldenberg, and B Scheiber-Mojdehkar. 2005. Recombinant human erythropoietin: Effects on frataxin expression in vitro. *Eur J Clin Invest* 35 (11): 711-7.
- Stylianopoulou, F, J Herbert, M B Soares, and A Efstratiadis. 1988. Expression of the insulin-like growth factor II gene in the choroid plexus and the leptomeninges of the adult rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1): 141-5.
- Sudarov, Anamaria, Rowena K Turnbull, Euseok J Kim, Melanie Lebel-Potter, Francois Guillemot, and Alexandra L Joyner. 2011. Ascl1 genetics reveals insights into cerebellum local circuit assembly. *J Neurosci* 31 (30): 11055-69.
- Suh, Yousin, Gil Atzmon, Mi-Ook Cho, David Hwang, Bingrong Liu, Daniel J Leahy, Nir Barzilai, and Pinchas Cohen. 2008. Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (9): 3438-42.
- Suleiman, M-S, R J R Singh, and C E H Stewart. 2007. Apoptosis and the cardiac action of insulin-like growth factor I. *Pharmacol Ther* 114 (3): 278-94. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725807000496>.
- Svensson, J, M Diez, J Engel, C Wass, A Tivesten, J-O Jansson, O Isaksson, T Archer, T Hökfelt, and C Ohlsson. 2006. Endocrine, liver-derived IGF-I is of importance for spatial learning and memory in old mice. *J Endocrinol* 189 (3): 617-27.

- Tanori, Mirella, Melissa Santone, Mariateresa Mancuso, Emanuela Pasquali, Simona Leonardi, Vincenzo Di Majo, Simonetta Rebessi, Anna Saran, and Simonetta Pazzaglia. 2010. Developmental and oncogenic effects of insulin-like growth factor-i in ptc1+/- mouse cerebellum. *Mol Cancer* 9:53.
- Tatar, Marc, Andrzej Bartke, and Adam Antebi. 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299 (5611): 1346-51.
- Tolbert, Daniel L and B Ruth Clark. 2003. GDNF and IGF-I trophic factors delay hereditary purkinje cell degeneration and the progression of gait ataxia. *Exp Neurol* 183 (1): 205-19.
- Tomassini, Barbara, Gaetano Arcuri, Silvia Fortuni, Chiranjeevi Sandi, Vahid Ezzatizadeh, Carlo Casali, Ivano Condò, et al. 2012. Interferon gamma upregulates frataxin and corrects the functional deficits in a friedreich ataxia model. *Hum Mol Genet* doi:10.1093/hmg/dds110.
- Torres-Aleman, I, S Pons, and M A Arévalo. 1994. The insulin-like growth factor I system in the rat cerebellum: Developmental regulation and role in neuronal survival and differentiation. *J Neurosci Res* 39 (2): 117-26.
- Torres-Aleman, I, V Barrios, A Lledo, and J Berciano. 1996. The insulin-like growth factor I system in cerebellar degeneration. *Ann Neurol* 39 (3): 335-42.
- Torres-Aleman, I, V Barrios, and J Berciano. 1998. The peripheral insulin-like growth factor system in amyotrophic lateral sclerosis and in multiple sclerosis. *Neurology* 50 (3): 772-6.
- Trejo, J L, E Carro, and I Torres-Aleman. 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 21 (5): 1628-34.
- Trejo, J L, J Piriz, M V Llorens-Martin, A M Fernandez, M Bolós, D LeRoith, A Nuñez, and I Torres-Aleman. 2007. Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol Psychiatry* 12 (12): 1118-28.
- Trejo, J L, M V Llorens-Martín, and I Torres-Alemán. 2008. The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an igf-i-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 37 (2): 402-11.
- Trejo, Jose Luis, Eva Carro, Cristina Lopez-Lopez, and Ignacio Torres-Aleman. 2004a. Role of serum insulin-like growth factor I in mammalian brain aging. *Growth Horm IGF Res* 14 Suppl A:S39-43.
- Trejo, José Luis, Eva Carro, Eva Garcia-Galloway, and Ignacio Torres-Aleman. 2004b. Role of insulin-like growth factor I signaling in neurodegenerative diseases. *J Mol Med (Berl)* 82 (3): 156-62.
- Valentinis, B, A Morrione, F Peruzzi, M Prisco, K Reiss, and R Baserga. 1999. Anti-apoptotic signaling of the IGF-I receptor in fibroblasts following loss of matrix adhesion. *Oncogene* 18 (10): 1827-36.

- Vázquez-Manrique, Rafael P, Pilar González-Cabo, Inmaculada Ortiz-Martín, Sheila Ros, Howard A Baylis, and Francesc Palau. 2007. The frataxin-encoding operon of *caenorhabditis elegans* shows complex structure and regulation. *Genomics* 89 (3): 392-401.
- Vázquez-Manrique, Rafael P, Pilar González-Cabo, Sheila Ros, Homera Aziz, Howard A Baylis, and Francesc Palau. 2006. Reduction of *caenorhabditis elegans* frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant. *FASEB J* 20 (1): 172-4.
- Vernadakis, A. 1996. Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 49 (3): 185-214.
- Vig, P J, D Desai, P Joshi, S H Subramony, J D Fratkin, and R D Currier. 1994. Decreased insulin-like growth factor I-mediated protein tyrosine phosphorylation in human olivopontocerebellar atrophy and lurcher mutant mouse. *J Neurol Sci* 124 (1): 38-44.
- Vincent, Andrea M, Bret C Mobley, Andrew Hiller, and Eva L Feldman. 2004. IGF-I prevents glutamate-induced motor neuron programmed cell death. *Neurobiol Dis* 16 (2): 407-16.
- Vincent, Andrea M and Eva L Feldman. 2002. Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm IGF Res* 12 (4): 193-7.
- Wagner, Bettina, Anuradha Natarajan, Sabine Grönaug, Renate Kroismayr, Erwin F Wagner, and Maria Sibilio. 2006. Neuronal survival depends on EGFR signaling in cortical but not midbrain astrocytes. *EMBO J* 25 (4): 752-62.
- Wang, H G, N Pathan, I M Ethell, S Krajewski, Y Yamaguchi, F Shibasaki, F McKeon, T Bobo, T F Franke, and J C Reed. 1999. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284 (5412): 339-43.
- Wells, R D and T Ashizawa. 2006. *Genetic Instabilities and Neurological Diseases*. Academic Pr.
- Wilczak, Nadine, Rob A I de Vos, and Jacques De Keyser. 2003. Free insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins 2, 5, and 6 in spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 361 (9362): 1007-11.
- Willis, John H, Grazia Isaya, Oleksandr Gakh, Roderick A Capaldi, and Michael F Marusich. 2008. Lateral-flow immunoassay for the frataxin protein in friedreich's ataxia patients and carriers. *Mol Genet Metab* 94 (4): 491-7.
- Wong, A, J Yang, P Cavadini, C Gellera, B Lonnerdal, F Taroni, and G Cortopassi. 1999. The friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum Mol Genet* 8 (3): 425-30.
- Wong, A, J Yang, S Danielson, C Gellera, F Taroni, and G Cortopassi. 2000. Sensitivity of FRDA lymphoblasts to salts of transition metal ions. *Antioxid Redox Signal* 2 (3): 461-5.

- Yakar, S, J L Liu, B Stannard, A Butler, D Accili, B Sauer, and D LeRoith. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (13): 7324-9.
- Yamagishi, Satoru, Tomoya Matsumoto, Daisaku Yokomaku, Hiroshi Hatanaka, Koji Shimoke, Masashi Yamada, and Toshihiko Ikeuchi. 2003. Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-jun in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 119 (2): 184-91.
- Yamamura, T, H Otani, Y Nakao, R Hattori, M Osako, and H Imamura. 2001. IGF-I differentially regulates bcl-xl and bax and confers myocardial protection in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 (3): H1191-200.
- Ye, P, Y Xing, Z Dai, and A J D'Ercole. 1996. In vivo actions of insulin-like growth factor-i (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: Evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res Dev Brain Res* 95 (1): 44-54.
- Ye, Ping, Greg J Popken, April Kemper, Ken McCarthy, Brian Popko, and A Joseph D'Ercole. 2004. Astrocyte-specific overexpression of insulin-like growth factor-i promotes brain overgrowth and glial fibrillary acidic protein expression. *J Neurosci Res* 78 (4): 472-84.
- Yoon, Taejin and J A Cowan. 2003. Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in isu-type proteins. *J Am Chem Soc* 125 (20): 6078-84.
- Yuan, J and B A Yankner. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407 (6805): 802-9.
- Zanella, Isabella, Manuela Derosas, Marcella Corrado, Emiliano Cocco, Patrizia Cavadini, Giorgio Biasiotto, Maura Poli, Rosanna Verardi, and Paolo Arosio. 2008. The effects of frataxin silencing in hela cells are rescued by the expression of human mitochondrial ferritin. *Biochim Biophys Acta* 1782 (2): 90-8.
- Zhang, W, B Ghetti, X L Yang, and W Lee. 1999. Alteration of IGF system gene expression during the postnatal development of pcd mice. *J Endocrinol* 163 (2): 191-8.
- Zhang, W, W H Lee, and L C Triarhou. 1996. Grafted cerebellar cells in a mouse model of hereditary ataxia express IGF-I system genes and partially restore behavioral function. *Nat Med* 2 (1): 65-71.
- Zhong, Jin, Jixian Deng, Jennifer Phan, Stephen Dlouhy, Huangbing Wu, Weiguo Yao, Ping Ye, A Joseph D'Ercole, and Wei-Hua Lee. 2005. Insulin-like growth factor-i protects granule neurons from apoptosis and improves ataxia in weaver mice. *J Neurosci Res* 80 (4): 481-90.
- Zhong, Jin, Jixian Deng, Su Huang, Xianlin Yang, and Wei-Hua Lee. 2004. High K⁺ and IGF-1 protect cerebellar granule neurons via distinct signaling pathways. *J Neurosci Res* 75 (6): 794-806.
- Zhong, Jin and Wei-Hua Lee. 2007. Hydrogen peroxide attenuates insulin-like growth factor-1 neuroprotective effect, prevented by minocycline. *Neurochem Int* 51 (6-7): 398-404.

Ziv, I, A Barzilai, D Offen, R Stein, A Achiron, and E Melamed. 1996. Dopamine-induced, genotoxic activation of programmed cell death. A role in nigrostriatal neuronal degeneration in parkinson's disease? *Adv Neurol* 69:229-33.